



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA  
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL  
E MEIO AMBIENTE**

**CALOGÊNESE E ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÕES  
CELULARES DE *Capsicum chinense* BRS MOEMA**

**WANESSA DE OLIVEIRA NOGUEIRA**

Porto Velho-RO  
2015



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA  
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL  
E MEIO AMBIENTE**

**CALOGÊNESE E ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÕES  
CELULARES DE *Capsicum chinense* BRS MOEMA**

**WANESSA DE OLIVEIRA NOGUEIRA**

**Orientador: Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos**

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade para a obtenção do Título de Mestre.

Porto Velho-RO  
2015

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

Nogueira, Wanessa de Oliveira.

N778c

Calogênese e estabelecimento de suspensões celulares de *Capsicum chinense*  
BRS Moema. / Wanessa de Oliveira Nogueira. Porto Velho / RO, 2015.  
59 fls.; il.

Orientador: Prof. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Fundação  
Universidade Federal de Rondônia.

1. *Capsicum chinense* - BRS Moema. 2. Pimenta. 3. Metabólitos secundários. I.  
Fundação Universidade Federal de Rondônia / UNIR. II. Título

CDU 582.926.2

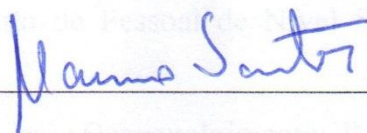
**Bibliotecária responsável: Rejane Sales – CRB 11/903**

WANESSA DE OLIVEIRA NOGUEIRA

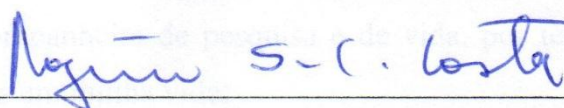
**CALOGÊNESE E ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÕES  
CELULARES DE *Capsicum chinense* BRS MOEMA**

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade para a obtenção do Título de Mestre.

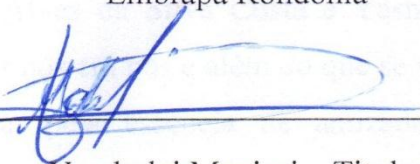
Comissão Examinadora



Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos - Orientador  
Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia



Rogério Sebastião Correa da Costa - Titular  
Embrapa Rondônia



Vanderlei Maniesi – Titular  
Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR

Artur de Souza Moret - Suplente  
Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR

Porto Velho, 11 de dezembro de 2015.

RESULTADO: APROVADA

## **AGRADECIMENTOS**

À minha amada mãe, Marilene de Oliveira Nogueira, pelo amor em verdade, pela verdade em forma de amor;

Ao meu querido pai, Geraldo Nogueira Neto, por uma vida em ensinamentos e dedicação;

Ao meu irmão, Marcus Winícius de Oliveira Nogueira, pelo companheirismo e pelos sorrisos desprendidos em momentos de descontração;

À minha família em geral, por todo carinho e amor;

Ao meu orientador Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos, pela oportunidade, amizade, ensinamentos e exemplo como professor e pesquisador;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pela oportunidade de estágio e pelo suporte físico e material no desenvolvimento desta pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante o mestrado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente da Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR;

À Caroline Vivian Smozinski, companheira de pesquisa e de vida, por ter sido a mais bela melodia de tons e sinfonia de cores em minha vida;

À Maurício Aguiar Mendes de Castro, por ser o infinito inefável em minha vida;

Às minhas doces, Thiciane Alves da Silva Costa e Yasminne Marjorie McComb Palácio Minotto, por sermos mais, por nós em nós e além do que se vê;

À Josilene Félix da Rocha, pela essência de amizade, carinho e aprendizagem que permaneceu e permanece;

Às minhas companheiras de pesquisa, Milene de Castro Melo Guimarães, Eloísa Santana Paz, Carolina Augusto de Souza e Glaura Mugrabe pela amizade e por colorir os dias de trabalho;

Aos meus colegas de sala do programa de mestrado, por todos os momentos, em especial à Tatiane, Juliana e Pollyana, pela amizade e dedicação;

Ao Técnico, Tiego, pela ajuda prestada;

Aos funcionários da Embrapa, Ozana e Neidemar por avivar as manhãs de trabalho;

E aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

Gratidão!

*“Mudar o modo de temer. Dissecando a flor.  
Dissertando que viver é não pensar. Aturando o  
tom. Maturando o bom. Se acontecendo. Acorda  
coragem. Acolhe a verdade. Alcançar. Além.  
Semear o amor”.*

*O Teatro Mágico*

## RESUMO

*Capsicum chinense* é uma espécie conhecida por suas substâncias provenientes do metabolismo secundário e que possui potencial inseticida. O objetivo dessa pesquisa foi estabelecer sistemas de cultivo de células em suspensão a partir de segmentos foliares e nodais da cultivar *Capsicum chinense* cv. BRS Moema, visando à produção de princípios ativos de interesse agropecuário. No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, explantes foliares e nodais foram retirados de plântulas cultivadas há 70 dias e com aproximadamente 10 cm de altura e, em câmara de fluxo horizontal, foram inoculados em meio Murashige & Skoog suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; e 4,0 mg. L<sup>-1</sup>) e BAP (0,0; 0,1; 0,5; 2,5 mg. L<sup>-1</sup>) em combinação fatorial. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1°C. Foram avaliadas a indução de calos (IC), a área coberta por células de calos (ACCC), a massa fresca (MF) e a massa seca (MS) dos explantes, aos 35 dias após a inoculação. Os tratamentos que resultaram em maior proliferação de células de calos foram repetidos para determinar a curva de crescimento dos calos, com foco na fase de desaceleração, quando os calos devem ser subcultivados para estabelecimento de suspensões celulares. Nos 49 dias subsequentes, explantes foram pesados a cada sete dias para estabelecer a curva de crescimento. Em seguida, as células de calo foram transferidas para frascos com 5 mL de meio líquido contendo 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP para explantes foliares e 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP para explantes nodais, visando à determinação da fase estacionária do crescimento das células em suspensão, quando a produção de metabólitos secundários atinge seu máximo. Para isso, nos 15 dias subsequentes, a cada três dias, suspensões foram filtradas e as células foram pesadas. As culturas foram mantidas em agitador a 40 rpm em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1°C. Os maiores valores de IC, ACCC, MF e MS foram observados no tratamento que combinou 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP (calos em 100% dos explantes foliares) e 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP (calos em 100% dos explantes nodais). As curvas de crescimento de calos e suspensões seguiram um padrão sigmóide. Nos explantes foliares, a fase de desaceleração do crescimento dos calos ocorreu do 40º ao 42º dia e em explantes nodais, 36º ao 42º dia. Não foi possível delimitar a fase estacionária do crescimento das suspensões celulares, mas pode-se inferir que a produção máxima de metabólitos secundários ocorre aproximadamente do 9º ao 10º dia em explantes foliares e do 5º ao 6º dia em explantes nodais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Pimenta, calos, metabólitos secundários.

## ABSTRACT

The species *Capsicum chinense* is known for its substances from the secondary metabolism and has insecticidal potential. The objective of this research was to establish cell suspension culture systems from leaf and nodal segments of the cultivar *Capsicum chinense* cv. BRS Moema, aiming at the production of active principles of agricultural importance. At the Plant Tissue Culture Laboratory of Embrapa Rondonia, leaf and nodal explants were taken from 70 day old seedlings with about 10 cm tall and, in a horizontal flow chamber, were inoculated in Murashige and Skoog medium supplemented with different concentrations of 2,4-D (0.0, 1.0, 2.0, and 4.0 mg. L<sup>-1</sup>) and BA (0.0, 0.1, 0.5, and 2.5 mg. L<sup>-1</sup>) in a factorial combination. Cultures were maintained in a growth room under a 16 hour photoperiod at 26±1°C. At the 35<sup>th</sup> day after inoculation, callus induction (CI), area covered by callus cells (ACCC), fresh mass (FM) and dry mass (DM) of the explants were evaluated. The treatments that resulted in higher proliferation of callus cells were repeated to determine the callus growth curve, focusing on the deceleration phase, when the calluses must be subcultured for establishment of cell suspensions. In the subsequent 49 days, every seven days, calluses were weighed in order to establish the growth curve. Then, the callus cells were transferred to flasks with 5 ml of liquid medium containing 2.0 mg. L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.1 mg. L<sup>-1</sup> BA for leaf explants and 2.0 mg. L<sup>-1</sup> 2,4-D + 2.5 mg. L<sup>-1</sup> BA for nodal explants, in order to determine the stationary phase of growth of cell suspensions, when the production of secondary metabolites reaches its maximum. For this, in the subsequent 15 days, every three days, suspensions were filtered and cells were weighed. The cultures were kept on a stirrer at 40 rpm in a growth chamber under a 16 hour photoperiod at 26±1°C. The higher values of CI, ACCC, MF and MS were observed in the treatment combining 2.0 mg. L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.1 mg. L<sup>-1</sup> BA (callus in 100% of leaf explants) and 2.0 mg. L<sup>-1</sup> 2,4-D + 2.5 mg. L<sup>-1</sup> BA (callus in 100% of nodal explants). The growth curves of calluses and suspensions followed a sigmoidal pattern. In leaf explants the deceleration of the callus growth took place from the 40<sup>th</sup> to the 42<sup>nd</sup> day; in nodal explants the 36<sup>th</sup> to the 42<sup>nd</sup> day. It was not possible to delimitate the stationary growth phase of the cell suspensions, but it can be inferred that the maximum production of secondary metabolites occurs approximately from the 9<sup>th</sup> to the 10<sup>th</sup> day in leaf explants and from the 5<sup>th</sup> to the 6<sup>th</sup> day in nodal explants.

**KEYWORDS:** Pepper, callus, secondary metabolites.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Pimentas do gênero <i>Capsicum</i> .	16
<b>Figura 2</b> – Plantas de <i>Capsicum chinense</i> BRS Moema.	18
<b>Figura 3</b> - Calos de <i>Capsicum chinense</i> BRS Moema. (A) Calos de explantes foliares. (B) Calos de segmentos nodais.	21
<b>Figura 4</b> - (A) Desinfestação de sementes de <i>C. chinense</i> BRS Moema. (B) Inoculação de sementes de BRS Moema em meio MS. (C) Plântulas de BRS Moema após 70 dias de cultivo.	28
<b>Figura 5</b> - (A) Células de calos friáveis de BRS Moema. (B) Células de calo em meio MS líquido suplementado com 2,4-D e BAP para suspensão celular. (C) Frascos com células de calos em agitador orbital a 40 rpm.	30
<b>Figura 6</b> - (A) Frascos contendo células de calo de BRS Moema. (B) Células de calo isoladas em membranas de acetado de celulose. (C) Bomba a vácuo para sucção de líquido.	31
<b>Figura 7</b> - Brotação a partir de explantes nodais de <i>C. chinense</i> BRS Moema em meio MS suplementado com 2,5 mg. L <sup>-1</sup> de BAP após 28 dias de cultivo.	34
<b>Figura 8</b> - Curva de crescimento de calos de <i>C. chinense</i> BRS Moema obtidos a partir de explantes foliares inoculados em meio MS, contendo 2,0 mg. L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L <sup>-1</sup> de BAP durante 35 dias de cultivo.	38
<b>Figura 9</b> – Desenvolvimento de calos em explantes foliares de <i>C. chinense</i> BRS Moema em meio MS suplementado com 2,0 mg. L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L <sup>-1</sup> de BAP. (A) Dia da inoculação; (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias; (G) 42 dias; (H) 49 dias.	38
<b>Figura 10</b> – Desenvolvimento de calos em explantes nodais de <i>C. chinense</i> BRS Moema em meio MS suplementado com 2,0 mg. L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,5 mg. L <sup>-1</sup> de BAP. (A) Dia da inoculação; (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias; (G) 42 dias; (H) 49 dias.	39
<b>Figura 11</b> - Curva de crescimento de calos de <i>C. chinense</i> BRS Moema obtidos a partir de explantes nodais inoculados em meio MS, contendo 2,0 mg. L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,5 mg. L <sup>-1</sup> de BAP durante 35 dias de cultivo.	39
<b>Figura 12</b> - Curva de crescimento de células de calos em suspensão de <i>C. chinense</i> BRS Moema obtidos a partir de explantes foliares inoculados em meio MS, contendo 2,0 mg. L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L <sup>-1</sup> de BAP durante 18 dias de cultivo.	40
<b>Figura 13</b> - Curva de crescimento de células de calos em suspensão de <i>C. chinense</i> BRS Moema obtidos a partir de explantes nodais inoculados em meio MS, contendo 2,0 mg. L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,5 mg. L <sup>-1</sup> de BAP durante 12 dias de cultivo.	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Porcentagens de indução de calos em explantes foliares de <i>C. chinense</i> BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L <sup>-1</sup> ) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L <sup>-1</sup> ), após 35 dias de cultivo.	32
<b>Tabela 2</b> – Médias em porcentagens da área coberta por células de calo (ACCC) em explantes foliares de <i>C. chinense</i> BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L <sup>-1</sup> ) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L <sup>-1</sup> ) após 35 dias de cultivo.	32
<b>Tabela 3</b> - Porcentagens de indução de calos em explantes nodais de <i>C. chinense</i> BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L <sup>-1</sup> ) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L <sup>-1</sup> ), após 35 dias de cultivo.	33
<b>Tabela 4</b> – Peso médio de massa seca de explantes foliares de <i>C. chinense</i> BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L <sup>-1</sup> ) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L <sup>-1</sup> ) após 35 dias de cultivo.	33
<b>Tabela 5</b> – Porcentagens de indução de calos em explantes nodais de <i>C. chinense</i> BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L <sup>-1</sup> ) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L <sup>-1</sup> ), após 35 dias de cultivo.	34
<b>Tabela 6</b> – Peso médio de massa fresca de explantes nodais de <i>C. chinense</i> BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L <sup>-1</sup> ) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L <sup>-1</sup> ) após 35 dias de cultivo.	35
<b>Tabela 7</b> - Peso médio de massa seca de explantes nodais de <i>C. chinense</i> BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L <sup>-1</sup> ) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L <sup>-1</sup> ) após 35 dias de cultivo.	36
<b>Tabela 8</b> - Explantes foliares de <i>C. chinense</i> BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L <sup>-1</sup> ) e 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L <sup>-1</sup> ), após 35 dias de cultivo.	36
<b>Tabela 9</b> - Explantes nodais de <i>C. chinense</i> BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L <sup>-1</sup> ) e 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L <sup>-1</sup> ), após 35 dias de cultivo.	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	Benzilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
GA3	Ácido Giberélico
KIN	Cinetina
2-iP	Isopenteniladenina
ZEA	Zeatina N-(4-hixdoxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina
AIA	Ácido 3-indolacético
ANA	Ácido naftalenoacético
AIB	Ácido indolbutírico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
v/v	Volume por volume
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro Quadrado
pH	Potencial de Hidrogênio
mg L <sup>-1</sup>	Miligrama por Litro
ml	Mililitro
μM	Micrômetro
μg/g	Micrograma por grama
rpm	Rotações por minuto
g L <sup>-1</sup>	Gramas por litro
°C	Grau Celsius
mm	Milímetro
ha	Hectare

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>1. OBJETIVOS</b>	14
1. OBJETIVO GERAL	14
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
2.1 O GÊNERO <i>Capsicum</i>	15
2.2 A ESPÉCIE <i>Capsicum chinense</i> BRS Moema	17
2.3 POTENCIAL INSETICIDA	19
2.4 A CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS E CALOGÊNESE	20
2.4.1 Reguladores de Crescimento	22
2.4.2 Curva de Crescimento de Células de Calo	23
2.4.3 Culturas de Células em Suspensão para Produção <i>in vitro</i> de Metabólitos Secundários	25
2.5 CONTRIBUIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	28
3.1 DESINFESTAÇÃO, INOCULAÇÃO DAS SEMENTES E PRODUÇÃO DOS EXPLANTES	28
3.2 CONDIÇÕES DE CULTURA	29
3.3 INDUÇÃO DE CALOS	29
3.4 ESTABELECIMENTO DE CURVA DE CRESCIMENTO DOS CALOS	29
3.5 ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÃO CELULAR	30
<b>4. RESULTADOS</b>	31
4.1 INDUÇÃO DE CALOS	31
4.2 CRESCIMENTO DOS CALOS	37
4.3 CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	40
<b>5. DISCUSSÃO</b>	42
5.1 INDUÇÃO DE CALOS	42
5.2 CRESCIMENTO DOS CALOS	46
5.3 CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	48
<b>CONCLUSÃO</b>	50
<b>REFERÊNCIAS</b>	51

## INTRODUÇÃO

Os vegetais produzem grande diversidade de compostos orgânicos que são conhecidos como metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural e de armazenamento de energia. Já os metabólitos secundários não possuem relação com crescimento e desenvolvimento das plantas. Esses metabólitos são em geral, defesas bioquímicas das plantas que podem atuar negativamente no comportamento e na fisiologia dos insetos, causando sua mortalidade.

Atualmente, a demanda de pesquisas tem se concentrando nas atividades biológicas de metabólitos secundários de plantas. Algumas espécies têm se revelado bastante eficazes para uso como inseticida botânico, além de outros efeitos biológicos, como atividade bactericida e também fungicida. Neste caso é importante o estímulo de estudos sobre novas técnicas de controle, incluindo-se a utilização de produtos naturais que sejam menos agressivos ao meio ambiente.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais podem ser alternativas viáveis para a exploração do potencial de plantas produtoras de substâncias bioativas, pois possibilita a produção de metabólitos secundários *in vitro* em sistemas conhecidos como suspensões celulares, além de permitir a produção de um elevado número de plantas em curto espaço de tempo e com alta qualidade genética e fitossanitária.

A espécie *Capsicum chinense* é mundialmente conhecida por sua importância econômica na indústria alimentícia, além de fornecer princípios ativos para a indústria farmacêutica, cosmética e para a agroindústria. As substâncias provenientes do seu metabolismo secundário podem ser utilizadas em práticas agrícolas alternativas que possuem potencial inseticida, devido às substâncias que são encontradas, tais como, alcalóides, flavonóides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais.

Na literatura atual, não há trabalhos que descrevam protocolos para a indução de calos em *Capsicum chinense* BRS Moema. A determinação de um protocolo para indução de calos e o estudo da curva de crescimento dos calos e da suspensão celular fornecerão subsídios para futuros trabalhos relacionados aos seus aspectos fitoquímicos e à bioatividade dos seus metabólitos secundários.

Diante da importância econômica e carência de estudos relacionados à produção *in vitro* de metabólitos secundários por essa espécie, o presente estudo visa ao estabelecimento

de um protocolo para calogênese a partir de explantes foliares e nodais de *C. chinense* BRS Moema avaliando diferentes concentrações de reguladores de crescimento (2,4-D e BAP), bem como a determinação da curva de crescimento dos calos, visando à identificação da fase desaceleração, que indica quando as células de calos devem ser subcultivadas em meio líquido para o estabelecimento de suspensões celulares para posterior produção de metabólitos secundários de interesse agrônômico e pecuário.

Essa pesquisa se insere em um projeto que a Embrapa Rondônia vem desenvolvendo que contempla a aplicação de metabólitos secundários contra carrapatos (*Rhipicephalus microplus*) de bovinos, como forma de minimizar os prejuízos que estes organismos causam à bovinocultura da região Amazônica, utilizando de extratos vegetais para o combate desses organismos, tornando assim, uma prática menos agressiva ao meio ambiente e reduzindo a utilização de inseticidas químicos.

Dessa forma espera-se contribuir para a solução do grande desafio dos sistemas de produção agropecuários que é o aumento da produtividade direcionado a atender à crescente demanda pela oferta de alimentos seguros produzidos com mais eficiência, maior competitividade e isentos de efeitos prejudiciais ao meio ambiente, e que ainda sejam de qualidade e não causem prejuízos à saúde daqueles que irão consumi-los.

# **1 OBJETIVOS**

## **1.1 OBJETIVO GERAL**

Estabelecer sistemas de cultivo de células em suspensão a partir de indução de calos e curvas de crescimento de folhas e segmentos nodais de *Capsicum chinense* BRS Moema, visando à produção de princípios ativos de interesse agrônômico e pecuário.

## **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estabelecer protocolos para indução de calos em explantes foliares e segmentos nodais de *C. chinense* BRS Moema em meio de cultivo suplementado com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP;
2. Determinar a curva de crescimento de calos induzidos em segmentos foliares e nodais de *C. chinense* BRS Moema, visando à identificação das fases de crescimento, com foco na fase de desaceleração, quando os calos devem ser repicados;
3. Determinar a curva de crescimento de suspensões celulares, identificando a fase em que ocorre a maior produção de metabólitos secundários.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O GÊNERO *Capsicum*

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae e apresenta cerca de 30 espécies que compreendem uma grande variedade de pimentas e pimentões, desde as doces até as com elevado grau de pungência. São originárias das Américas sendo encontradas principalmente em zonas tropicais e produzidas em diversos países (MAPELI et al., 2011).

A evolução desse gênero ocorreu a partir de uma forma ancestral na área da Bolívia-Peru, permitindo a associação ao homem a mais ou menos 10 ou 12 mil anos, quando as primeiras populações habitaram as Américas (BASU, 2003).

Foi a partir da intensificada movimentação das populações européias entre as comunidades indígenas, que os espanhóis e os portugueses foram os primeiros a ter contato com a pimenta do gênero *Capsicum*, disseminando-a assim para vários lugares, onde adquiriu características e nomes próprios (RUFINO & PENTEADO, 2006).

Acredita-se também que a dispersão desse gênero possa ter sido feita por pássaros migratórios que, ao irem de uma região para outra, distribuíam as sementes em novas áreas (WITT & BOSLAND, 1997).

Esse gênero possui cerca de 35 táxons (espécies e variedades), classificados em categorias de acordo com o nível de domesticação, sendo cinco táxons domesticados e trinta silvestres (semidomesticados e silvestres) (REIFSCHNEIDER, 2000; De WITT e BOSLAND, 2009).

*Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L. e *Capsicum pubescens* são considerados os cinco táxons domesticados (BIANCHETTI, 1996).

Segundo Pickergill (2007), *C. annuum* var. *annuum* e *C. frutescens* foram domesticadas entre o centro do México e o noroeste da Costa Rica, *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. pubescens* na região Andina, e *C. chinense* na região da Planície Tropical da América do Sul.

Barboza & Bianchetti (2005) descrevem 3 novas espécies de *Capsicum* de ocorrência na costa leste do Brasil: *Capsicum pereirae* (Espírito Santo e Minas Gerais), *Capsicum friburguense* (endêmica e de uma área restrita de Nova Friburgo, Rio de Janeiro) e *Capsicum hunzikerianum* (São Paulo).



**Figura 1** - Pimentas do gênero *Capsicum*.



O gênero *Capsicum* é reconhecido por sua pungência e flavor e é o único da família Solanaceae que possui o alcalóide capsaicina (8-metil-N-vanilil 1-6-nonamida), composto químico pungente sintetizado e acumulado nos tecidos da placenta de seus frutos (BOSLAND & VOTAVA, 1999). A atividade antioxidante dos capsaicionóides inibe a peroxidação de lipídios, justificando o seu uso como antioxidantes naturais (REIFSCHNEIDER, 2000; RISTORI et al., 2002).

A capsaicina possui extensa variedade de benefícios terapêuticos e é utilizada pela população no combate ou amenização da síndrome de pós-mastectomia, urticária, psoríase, neuropatia diabética, artrite, prurido vaginal, alergias, neuromas póscirúrgicos (KNOTKOVA et al., 2008), regulação da pressão arterial, metabolismo da gordura pela ação termogênica (LEUNG, 2008), prevenção de câncer (SURH, 2003) e ação antibacteriana (TEWKSBURY et al., 2008). A capsaicina em ação conjunta com o  $\beta$ - caroteno e as vitaminas A e C atuam na diminuição do nível de gordura no sangue, possuem ação expectorante ajudando a descongestionar vias (LEUNG, 2008), ação anti-inflamatória e antioxidante (TEWKSBURY et al., 2008).

As plantas do gênero *Capsicum* possuem polinização cruzada, embora autógamas, o que facilita a sua reprodução, ocorrendo entre indivíduos dentro da mesma espécie e entre

espécie desse gênero (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008), favorecendo alterações morfológicas na flor pela ação de insetos polinizadores e por práticas de cultivo (RIBEIRO et al., 2008).

Existem atualmente, no Brasil, inúmeras pesquisas sobre o potencial inseticida de algumas plantas nativas. As plantas do gênero *Capsicum*, estão suscetíveis a esses estudos pois são encontradas substâncias com atividade inseticida e de repelência, tais como alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais, provenientes do metabolismo secundário.

## **2.2 A ESPÉCIE *Capsicum chinense* BRS MOEMA**

A espécie *Capsicum chinense* teve origem nas Américas, sendo a mais difundida, na América tropical. Possui a maior área de diversidade situada na Bacia Amazônica, de onde se pode concluir ter sido domesticada pelos indígenas, e, portanto, considerada como a mais brasileira entre as espécies domesticadas (REIFSCHEIDER, 2000).

Pertencente à família Solanaceae, essa espécie compreende 31 gêneros e cerca de 500 espécies nativas ocorrendo em diversas partes do mundo, tendo como centro de diversidade a América do Sul (HUNZIKER, 2001). A expansão global mais limitada da espécie se deve mais provavelmente à sua descoberta na América do Sul, depois de *C. annuum* já ter sido estabelecida no Continente Europeu (ESHBAUGH, 1993).

A variedade *C. chinense* BRS Moema pertence ao grupo varietal popularmente conhecido como “biquinho”. Esta cultivar surgiu em 2003 no Triângulo Mineiro, quando os agricultores a utilizavam somente para consumo próprio. Com a demanda crescente de produtores e indústrias e principalmente pela perda gradativa de sua principal característica de ser picante, a Embrapa Hortaliças a selecionou e desenvolveu a partir da população CNPH 3870 (RIBEIRO et al., 2008).

As plantas de BRS Moema têm hábito de crescimento intermediário, com cerca de 60 cm de altura e um metro de diâmetro. Os frutos apresentam coloração verde quando imaturos, alaranjada em fase de maturação e vermelha quando maduros devido à presença do carotenóide capsantina (23 µg/g), medindo aproximadamente 1,5 cm de largura por 2,6 cm de comprimento e 3 mm de espessura de parede. O formato triangular pontiagudo dos frutos, como um “biquinho”, dá origem ao nome comum deste grupo. Nas condições de cultivo do

Brasil Central, a colheita dos frutos maduros tem início cerca de 90 dias após o transplântio das mudas para o campo (RIBEIRO et al., 2008).

**Figura 2** – Plantas de *Capsicum chinense* BRS Moema.



A BRS Moema apresenta resistência ao nematóide das galhas (*Meloidogyne javanica*) e a uma espécie de potyvírus, o *Pepper yellow mosaicvirus* (PepYMV), que é considerado um dos principais patógenos que afetam a cultura no país (RIBEIRO et al., 2008).

Essa cultivar se destaca pelo alto grau de uniformidade das plantas e dos frutos, número elevado de frutos por planta e, principalmente, em relação à ausência de pungência nos frutos. Esta é uma característica ainda não estabilizada em algumas das populações do grupo “biquinho” cultivadas no Brasil. Possui potencial tanto para o mercado de frutos frescos como para o processamento de conservas para aperitivos e geléias, uma vez que seus frutos são aromáticos, crocantes, saborosos e atendem àqueles consumidores que não consomem pimentas ardidas. BRS Moema pode, também, ser utilizada como pimenta ornamental (RIBEIRO et al., 2008).

No Brasil, o cultivo de pimenta se adapta perfeitamente ao modelo de agricultura familiar e de integração pequeno agricultor-indústria, pois em sua maioria, as pimentas são cultivadas em unidades familiares e com baixo uso de insumos (REIFSCHNEIDER & RIBEIRO, 2008). Entretanto, esse mercado proporciona grandes perspectivas e potencialidades, pela versatilidade de suas aplicações culinárias, industriais, medicinais e

ornamentais. Segundo a Embrapa Hortaliças, esse mercado gera uma renda bruta variável de 4 a 12 mil reais ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, desde o preparo do solo até a sua colheita (RUFINO & PENTEADO, 2006).

## 2.3 POTENCIAL INSETICIDA

O uso de inseticidas químicos possui efeitos indesejáveis e com isso, a preocupação dos consumidores quanto à qualidade dos alimentos, o que tem incentivado estudos sobre novas técnicas de controle (TAVARES, 2002). Estas técnicas incluem a utilização de produtos naturais que sejam menos agressivos ao meio ambiente, pois a utilização intensiva e indiscriminada dos inseticidas químicos na produção agropecuária favoreceu o surgimento de pragas secundárias, resistência por parte dos insetos e outras pragas e efeitos cumulativos sobre o ambiente, não conseguindo eliminar os problemas já existentes (MARTINEZ, 2002).

Desse modo, surgiu a necessidade de modificar a forma de combater esses organismos, com a utilização de extratos vegetais, o que se tornou uma prática cada vez mais constante para os agricultores, principalmente da linha de produção orgânica e agricultura familiar para controle biológico e sistemas de manejo (INNECCO, 2006).

A demanda de pesquisas tem se concentrando nas atividades biológicas de metabólitos secundários de plantas, pois são muito utilizados na medicina popular como medicamentos, cosméticos, matéria-prima (BIAVATTI et al., 2007; BARBOSA-FILHO et al., 2008). Estes metabólitos em geral são defesas bioquímicas das plantas que podem atuar negativamente no comportamento e na fisiologia dos insetos, causando sua mortalidade (FRIGHETTO, 1997).

O interesse por essas substâncias cresceu muito, por ser uma alternativa segura e econômica para agricultores, sendo facilmente biodegradável em relação a inseticidas sintéticos, visto que esses princípios são resultantes do metabolismo secundário das plantas, estando acumulados em pequenas proporções nos tecidos vegetais com diversas funções específicas, entre elas, a defesa contra insetos (MUSETTI, 1991).

Nas plantas do gênero *Capsicum* são encontradas substâncias com atividade inseticida e de repelência, tais como alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais, provenientes do metabolismo secundário (LUZ, 2007).

Pesquisas apontam a eficiência de plantas do gênero *Capsicum* e de outras plantas com efeito medicinal que possuem efeito inseticida, devido às várias substâncias encontradas. Guimarães et al. (2014) utilizou extratos aquosos de sementes de pimenta dedo-de-moça e

verificou a atividade repelente sobre o gorgulho do milho, fator importante para utilização em propriedades rurais, especialmente na fruticultura. Haas et al. (2014) testaram a ação inseticida de extratos aquosos de folhas de eucalipto (*Eucalyptus robusta*), guaco (*Mikania laevigata*) e folhas e frutos de pimenta (*Capsicum baccatum*) e observaram que os extratos de *E. robusta* e folhas de *C. baccatum* resultaram em maior mortalidade e menor peso na fase larval de *Spodoptera frugiperda* (Lagarta-do-cartucho) sendo promissores para testes em campo no controle dessa praga.

Porém, na literatura não há trabalhos realizados com a utilização de metabólitos secundários de *C. chinense* BRS Moema obtidos a partir de suspensão celular como prática alternativa para a agricultura ou pecuária, sendo essa pesquisa uma das pioneiras e de grande importância para que outros sejam realizados.

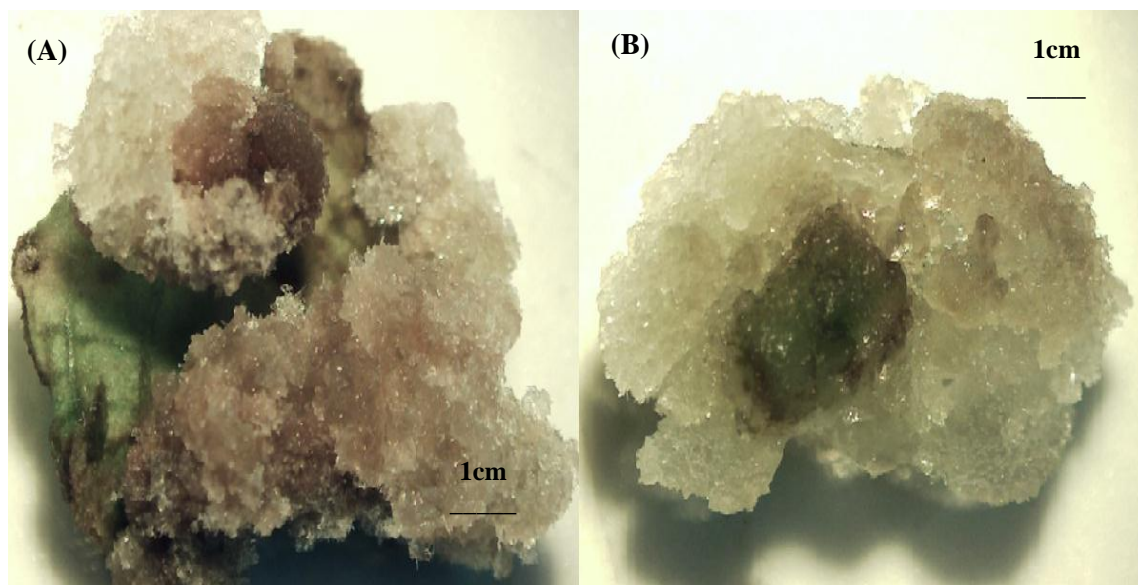
## **2.4 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS E CALOGÊNESE**

A cultura de tecidos vegetais consiste no cultivo de células ou tecidos vegetais sob condições químicas e físicas apropriadas, representando uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (GIACOMETTI, 1990). Nessa técnica pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos, em um meio de cultura apropriado contendo reguladores de crescimento que contribuem para o desenvolvimento e multiplicação de células no explante, sendo, portanto, direta ou indiretamente, esta última, via formação de calos (TORRES et al., 2000).

O calo é um tecido que se desenvolve em resposta a uma injúria, podendo esta ser física ou química. Células do calo são diferenciadas, embora desorganizadas, sendo que as células diferenciadas apresentam-se altamente vacuolizadas, com citoplasma fino e células muito grandes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).



**Figura 3** - Calos de *Capsicum chinense* BRS Moema. (A) Calos de explantes foliares. (B) Calos de segmentos nodais.



O cultivo de calos pode ser utilizado para se estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, obter suspensão celular e propagação via formação de gemas ou embriões somáticos (LANDA et al., 2000).

Os principais fatores que influenciam a formação de calos são o tipo de explante, reguladores de crescimento, os quais alteram o metabolismo celular e causando a diferenciação, bem como de condições físicas de incubação, como luz e temperatura. A especialização celular é revertida fazendo com que o explante dê origem a um novo tecido composto por células meristemáticas não diferenciadas. Durante a multiplicação celular, algumas células diferenciadas tendem a ser formadas por meio de centros de morfogênese, mesmo que o calo continue desorganizado (GEORGE et al., 2008).

O tipo de calo formado em um determinado genótipo, seu grau de diferenciação celular e potencial morfogênético dependem, sobretudo do explante, meio de cultura e fitoreguladores. Também podem diferir em textura, consistência e coloração. Alguns calos são compactos e crescem vagorosamente, outros são friáveis e são mais difíceis de manipular (FLORES et al., 2006).

Os calos podem ser multiplicados e armazenados *in vitro* por longos períodos, sendo importantes para estudos morfogênicos e realização de suspensão de células para a obtenção de produtos secundários, tendo sido observado como uma biotecnologia de amplo interesse tanto científico quanto comercial (SADO, 2009).

A cultura de tecidos tem sido apontada como valioso recurso para o estudo dos metabólitos primário e secundário, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos farmacológicos importantes. Pesquisas têm demonstrado sucesso na produção de metabólitos secundários em diferentes órgãos e culturas não organizadas como calos e suspensão de células (FURDEN et al., 2005; GYORGY et al., 2005).

Devido ao interesse pelas atividades medicinais e alimentícias, pela importância econômica e para a agroindústria promovida pela espécie *C. chinense*, existe a necessidade de um aumento e melhora em sua produção, visando melhorar qualitativa e quantitativamente a produtividade de culturas. A técnica de cultura de tecidos pode ser uma alternativa viável, sendo possível com a utilização de fitorreguladores (VIEIRA & CASTRO, 2004).

#### **2.4.1 Reguladores de Crescimento**

Reguladores de crescimento possuem substâncias químicas sintéticas que têm efeito sobre o metabolismo vegetal, e a composição e concentração destes, no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (LAMAS, 2001). Reguladores vegetais são adicionados ao meio de cultura para auxiliar o crescimento e também são importantes no direcionamento da resposta do desenvolvimento dos propágulos (HARTMANN et al., 2002). A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura propiciou amplo avanço das técnicas que constituem a biotecnologia atual (FRANÇA, 2001).

Dentre os fitorreguladores utilizados na fase de multiplicação destacam-se as citocininas, as quais participam de vários processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo a divisão celular, morfogênese da parte aérea e das raízes e senescência (CALDAS, et al., 1998).

As citocininas são reguladores de crescimento que desempenham um papel fundamental no crescimento e cultura de tecidos, estimulando a divisão celular, bem como a indução e a proliferação de gemas axilares, além de quebrarem a dominância apical. O tipo de citocinina e sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (SCHUCH & ERIG, 2005). Dentro do grupo de citocininas encontramos BAP (benzilaminopurina), KIN (cinetina), 2-iP (2-isopentenil adenina) e ZEA (zeatina), as quais são empregadas para formação de brotos. O uso de citocininas é muito favorável na fase de

multiplicação *in vitro*, sendo o tipo e a concentração os principais fatores que influenciam no processo (SOUZA, 2003).

As auxinas, ácido indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indol 3-butírico (AIB), podem ser utilizados na fase de multiplicação, porém em baixas concentrações (CALDAS et al., 1998; HARTMANN et al., 2002). Já o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), que também é uma auxina, é usado para promover a formação de calos e pode também causar variação genética no cultivo de células ou de tecidos (GEORGE, et al., 2008). As auxinas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido indol-3-acético (AIA), que é a auxina principal de várias plantas. Essas substâncias têm em comum a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento (KRIKORIAN, 1991). Entre outras substâncias usadas para o enraizamento *in vitro* estão o ANA, 2,4-D e AIB (ROSS, 1992).

As auxinas são geralmente utilizadas quando o propósito for o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular (formação de calo), a formação de raízes e a embriogênese dos cultivos em suspensão; já as citocininas são frequentemente utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações múltiplas (PIERIK, 1990; GEORGE, et al., 2008). As auxinas podem ser desnecessárias e podem reduzir a capacidade dos brotos de enraizar. Já a adição de mais de uma citocinina pode aumentar a produção ou melhorar a qualidade dos brotos (GEORGE et al., 2008).

Os reguladores de crescimento maximizam a produção de metabólitos secundários. Algumas pesquisas demonstram que o gênero *Capsicum* bem como outras espécies medicinais, é capaz de produzir calos friáveis, o que é totalmente adequado para suspensões celulares, dependendo do tipo de explante e combinação entre os reguladores de crescimento (MOGOR et al., 2007).

#### **2.4.2 Curva de Crescimento de Células de Calo**

O calo deve ser avaliado quanto à velocidade de seu crescimento, bem como as concentrações intracelulares e extracelulares dos metabólitos (FUMAGALI et al., 2008). De acordo com Santos et al. (2007), as curvas de crescimento dos calos são importantes para identificar os estágios dos processos fundamentais de crescimento, permitindo inferir sobre o exato momento de subcultivar os calos em um novo meio de cultivo ou a possibilidade da sua



utilização em suspensões celulares, visando a produção de metabólitos secundários em espécies medicinais.

O crescimento e o desenvolvimento de calos podem ser verificados pela sua curva de crescimento, que normalmente exhibe cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (GEORGE et al., 2008; CASTRO et al., 2008). A fase lag se caracteriza como a de maior produção de energia, correspondendo ao período que as células se preparam para o início da divisão celular, visando sua expansão, onde ocorre o início da mobilização de metabólitos, síntese de proteínas e compostos específicos, resultando em um pequeno crescimento de calos. A fase exponencial é biossintética, possuindo maior crescimento de calos, devido à alta taxa de divisão celular e ao aumento do número de células. A fase linear caracteriza-se por diminuição da divisão, mas aumento de volume celular; a fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, pois ocorre a redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar, consequência da redução do oxigênio no interior das células. Na fase estacionária, ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários (SMITH, 1992).

As células individuais ou órgãos tendem a apresentar um crescimento ilimitado, que obedece a um padrão exponencial. Em geral, volume, massa ou superfície, altura, número de células ou mesmo conteúdo de proteína, mostram padrão sigmóide devido às interações mútuas entre indivíduos que infligem limitações ao crescimento, fazendo com que a curva sofra uma inflexão, e os organismos tendem a desenvolver uma conformação sigmóide, devido a eventuais limitações de espaço e/ou nutrientes ou acúmulo de produto final (PEIXOTO et al., 2011).

Os compostos pigmentados formados nos calos podem estar relacionados à senescência do calo como uma resposta ao estresse proporcionado provavelmente por um déficit de hormônios, nutrientes ou água, condições que provocam um aumento em radicais livres (ARNALDOS, 2001; SMITH, 2012).

Nessa pesquisa, a determinação da curva de crescimento dos calos de *C. chinense* BRS Moema foi importante, pois foi possível a identificação da fase de desaceleração, que indica quando as células de calos devem ser subcultivadas em meio líquido para o estabelecimento de suspensões celulares para posterior produção de metabólitos secundários.

### 2.4.3 Culturas de Células em Suspensão para Produção *in vitro* de Metabólitos Secundários

As técnicas de cultura de tecidos vegetais podem ser alternativas viáveis para a exploração do potencial de plantas produtoras de substâncias bioativas, pois possibilita a produção de metabólitos secundários *in vitro* em sistemas conhecidos como suspensões celulares (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; FUMAGALI et al., 2008).

A calogênese é a etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações (VENTURIERI & VENTURIERI, 2004).

Explantos oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de calo e para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Para isso, faz-se necessário determinar protocolos eficientes para a indução e manutenção de calos friáveis. Adicionalmente, a constatação de que ocorrem modificações no teor de compostos de acordo com o grau de diferenciação dos tecidos, levou ao desenvolvimento de um grande número de pesquisas com o intuito de estudar a viabilidade de produção de compostos em calos com diferentes características, principalmente no que diz respeito à consistência e ao potencial morfogênico (FLORES et al., 2006).

Concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie. A produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina, mas a adição de citocinina pode aumentar a proliferação do mesmo, podendo ser multiplicados por sucessivas subculturas, mantidos *in vitro* por longos períodos e são de grande importância para estudos morfogenéticos *in vitro* e através da suspensão de células para a obtenção de produtos secundários, incluindo fármacos, representam uma biotecnologia de grande interesse científico e comercial (REBOUÇAS & ALMEIDA, 2009).

A cultura de células em suspensão consiste em agregados celulares dispersos em meio líquido sob agitação constante, mantidas no escuro a fim de evitar possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura, para obtenção e propagação destas. As suspensões celulares exibem maior taxa de divisão celular, permitindo um crescimento mais acelerado

devido ao contato direto das células com os nutrientes do meio. Por meio da suspensão de células é possível obter uma propagação clonal em larga escala utilizando pouco espaço e livre de patógenos (GUERRA et al., 1996).

De acordo Verpoorte & Maraschin. (2001) as células em suspensão constituem um bom material biológico para estudos sobre rotas biossintéticas. Quando comparado às culturas de calos, as células em suspensão permitem a recuperação de grandes quantidades de células das quais as enzimas podem ser facilmente isoladas. Na cultura de células em suspensão, a maioria dos metabólitos secundários é produzida durante a fase estacionária (MACHADO et al., 2006).

Visando otimizar a produção *in vitro* de compostos de interesse farmacológico, biorreatores têm sido empregados devido aos menores custos e capacidade de produzir tecidos diferenciados contendo significativas quantidades de metabólitos secundários (WILKEN et al., 2005; GERTH et al., 2006). Nesse sentido, a cultura de tecidos dispõe alternativas para uma maior produção de biomassa e para garantir a perpetuação de espécies de interesse econômico (MORAIS et al., 2012).

## **2.5 CONTRIBUIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL**

A história do desenvolvimento econômico revela que as nações que alcançaram níveis satisfatórios de crescimento o fizeram à custa de perdas ambientais. Por isso, cresce a consciência mundial sobre a importância da preservação do meio ambiente, o que permite prever que esse será um dos temas que demande definições e ações efetivas das instituições públicas, em especial, daquelas formuladoras de políticas econômicas e de ciência e tecnologia, fazendo surgir bases teóricas para um crescimento econômico com preservação ambiental (TAVARES, 2008).

O processo de desenvolvimento regional vem-se prestando para acelerar o uso dos recursos bióticos e, ao mesmo tempo, tem pouca preocupação quanto à necessidade de conservá-los. São quatro as fases que caracterizam a evolução extrativista dos recursos vegetais da Amazônia: expansão; estabilização, onde há o equilíbrio entre oferta e demanda; declínio, causado pela redução dos recursos e, por fim, o plantio domesticado, que começa a se formar ainda na estabilização a partir de tecnologias e práticas comerciais que favoreçam as condições de plantio (BARBOSA, 2001).

No início da década de 1990, a EMBRAPA reconheceu que o desenvolvimento agrícola amazônico deve incluir extrativismo, manejo florestal e agroflorestal, além da agricultura convencional, tendo transformado todos seus centros na Amazônia em Centros de Pesquisa Agroflorestal. Para a EMBRAPA, os sistemas de produção são não-convencionais, mais orientados para o pequeno proprietário e conservação da biodiversidade do que para os sistemas agrícolas convencionais (CLAY et al., 1999).

As tecnologias emergentes prometem maior produtividade, mais eficiência e menos poluição, que beneficiem a natureza em altas proporções, a fim de atender as necessidades humanas básicas, pois um desenvolvimento agrícola rápido e sólido representa não só mais alimento, como também conservação dos recursos naturais (LIMA, 2011).

Atualmente, os sistemas de produção agropecuários enfrentam o grande desafio de aumento da produtividade direcionado a atender à crescente demanda pela oferta de alimentos seguros produzidos com mais eficiência, maior competitividade e isentos de efeitos deletérios ao meio ambiente, e que ainda sejam de qualidade e não causem danos à saúde daqueles que irão consumi-los. Países que despontam como grandes produtores de alimentos já alinharam à produção de alimentos com qualidade, principalmente no que diz respeito à ausência de resíduos químicos utilizados no combate de pragas e agentes infecciosos que incidem sobre os sistemas agropecuários. Dentre as plantas presentes na flora Amazônica com potencial parasiticida, atualmente estudada, as do gênero *Capsicum* têm-se revelado bastante eficazes para uso como inseticidas botânicos, pois possuem metabólitos secundários como, alcalóides, flavonóides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais (PARMAR et al., 1998).

Uma vez evidenciado o efeito das amidas de *C. chinense* e que tenha sido validado o sistema de produção *in vitro* destas substâncias em suspensões celulares, estes sistemas serão passíveis de utilização por laboratórios químicos, disponibilizando um produto livre dos problemas usualmente associados aos produtos químicos comercializados convencionalmente, como a ocorrência de resistência aos produtos.

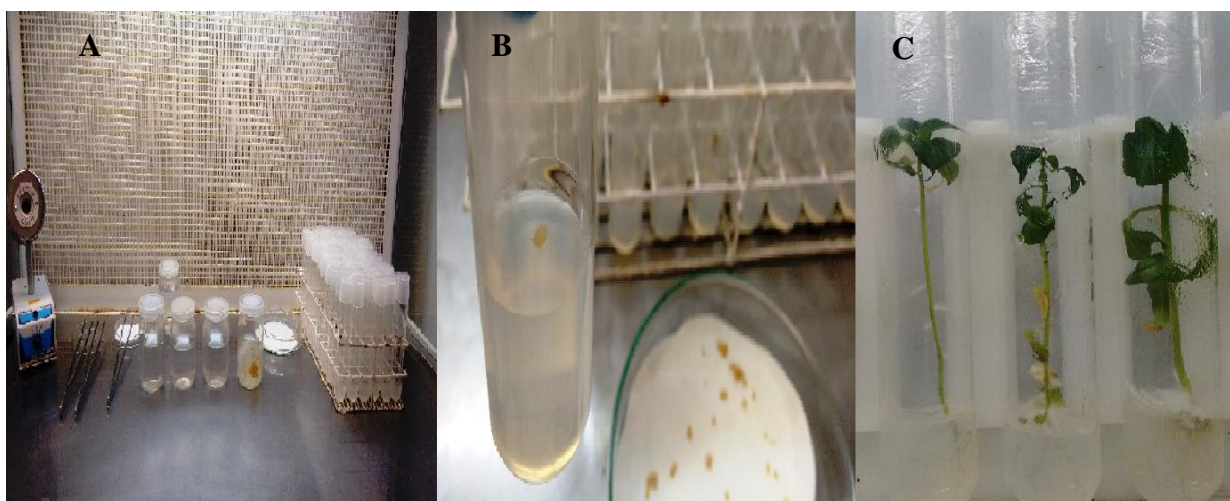
Com isso, espera-se que haja uma minimização do impacto ambiental causado pelo controle de carrapatos na pecuária da Região Norte. O estudo almeja também impactar positivamente o custo de produção de leite e carne na região, além de agregar valor à sua produção, com a disponibilização de um carrapaticida natural.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DESINFESTAÇÃO, INOCULAÇÃO DE SEMENTES E PRODUÇÃO DE EXPLANTES

Sementes de *C. chinense* BRS Moema, adquiridas em comércio local, foram levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Rondônia e em câmara de fluxo horizontal, foram imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e em hipoclorito de sódio 2,0 % (v/v) por 15 minutos e em seguida, enxaguadas três vezes com solução estéril de água destilada. As sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo meio MS contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 3% (p/v) de sacarose e 0,6% (p/v) de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar, seguido por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas a 26±1°C. Após 70 dias de cultivo, as plantas apresentaram um tamanho médio de 10 cm de altura, e foram levadas à câmara de fluxo para que os explantes fossem retirados, sendo folhas e segmentos nodais com mais ou menos 1cm<sup>2</sup>.

**Figura 4** - (A) Desinfestação de sementes de *C. chinense* BRS Moema. (B) Inoculação de sementes de BRS Moema em meio MS. (C) Plântulas de BRS Moema após 70 dias de cultivo.



### 3.2 CONDIÇÕES DE CULTURA

Os explantes foram reduzidos a segmentos de 1cm<sup>2</sup> em placas de Petri esterilizadas e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 3% (p/v) de sacarose e 0,6% (p/v) de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar, seguido por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. O meio de cultivo foi suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-benzilaminopurina (BAP), em combinação fatorial. Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas a 26±1°C.

### 3.3 INDUÇÃO DE CALOS

Os explantes foliares e nodais foram transferidos para o meio suplementado com combinação fatorial de 2,4-D nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup> e BAP nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L<sup>-1</sup>, totalizando 16 tratamentos, onde foram colocados individualmente com a superfície abaxial em contato com o meio. Foi avaliada a formação de calos nos explantes a cada sete dias, durante 35 dias. Os tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinco tubos de ensaio por tratamento, cada um contendo um explante. Foi avaliada a porcentagem da área do explante coberta por células de calo, de acordo com Mendonça et al. (2013), que atribuem notas para a porcentagem de área coberta por células de calos: 0 = 0%, 1 = 25%, 2 = 50%, 3 = 75% e 4 = 100%. Em seguida, os calos foram submetidos a pesagens para análise de massa fresca (MF) e levados à estufa para secagem e obtenção de massa seca (MS). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.4 ESTABELECIMENTO DE CURVA DE CRESCIMENTO DOS CALOS

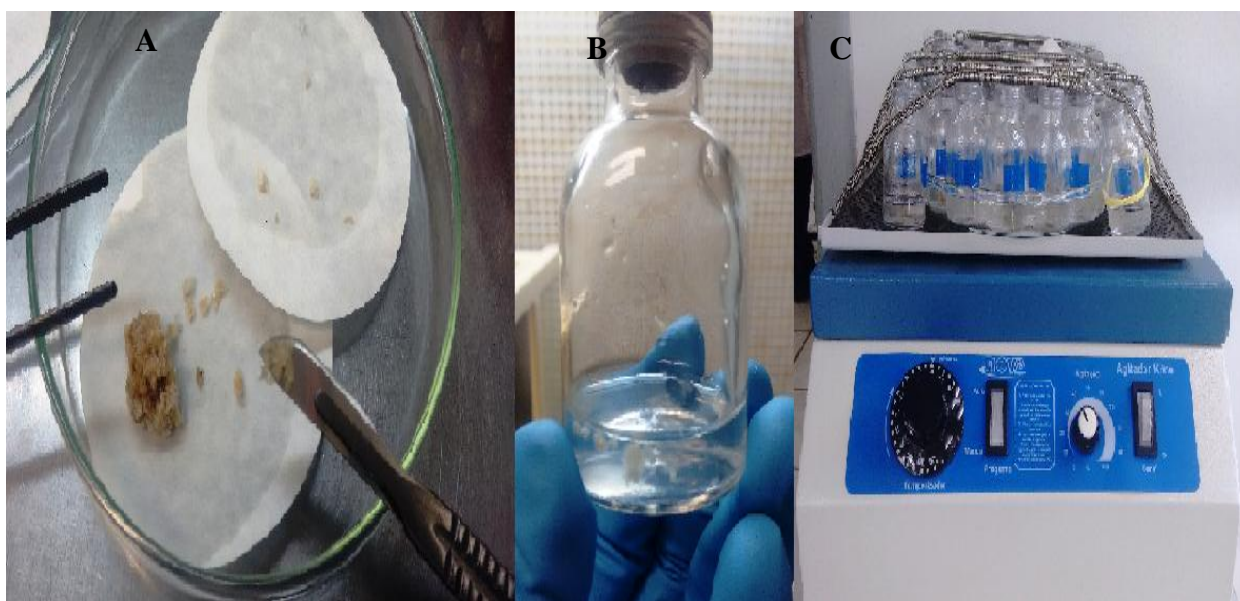
Para determinação da curva de crescimento de calos foliares e nodais, os explantes foram inoculados no tratamento que apresentou maior eficiência na indução e proliferação de calos, sendo a combinação de 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP para explantes foliares e 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP para explantes nodais. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1°C. As avaliações do desenvolvimento dos calos foram realizadas nos 35 dias

subsequentes, em intervalos de sete dias. Em cada avaliação, três calos foram cuidadosamente limpos com papel toalha para retirar o excesso de meio de cultura e pesados individualmente em balança de precisão obtendo-se o peso fresco médio dos três explantes. Estes explantes foram colocados em estufa a 50°C até atingir peso constante e foram novamente pesados para obtenção do peso seco. Com os resultados foi estabelecida a curva de crescimento com as fases lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio. A curva de crescimento foi plotada a partir da média das três repetições em cada tempo de determinação de massa fresca.

### 3.5 ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÃO CELULAR

Em câmara de fluxo os calos friáveis obtidos foram subcultivados em pequenos frascos contendo 5 ml de meio de cultura MS líquido suplementado com 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP para calos de explantes foliares e 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP para calos de explantes nodais e 30 g. L<sup>-1</sup> de sacarose. Cada frasco recebeu 0,05g de massa celular úmida de calos de ambos os explantes e foram mantidos em sala de crescimento em agitador orbital a 40 rpm (Figura 5).

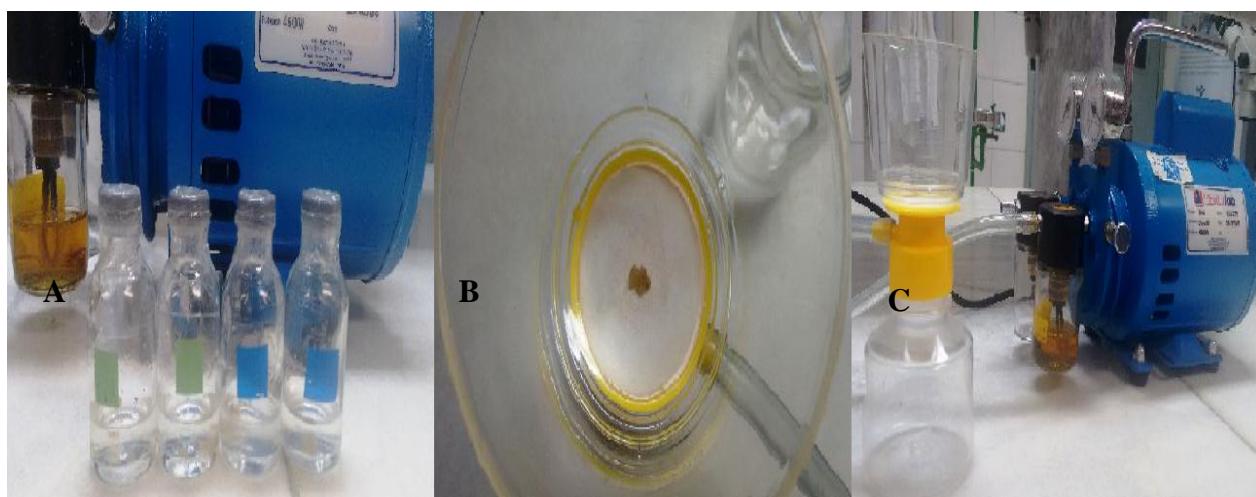
**Figura 5** - (A) Células de calos friáveis de BRS Moema. (B) Células de calo em meio MS líquido suplementado com 2,4-D e BAP para suspensão celular. (C) Frascos com células de calos em agitador orbital a 40 rpm.





A cada 3 dias, dois frascos de ambos os explantes, eram retirados do agitador, e as células de calos, juntamente com o meio restante, foram colocadas sobre membranas de acetado de celulose com orifícios de 0,2  $\mu\text{m}$  e submetidas a filtração em bomba a vácuo. As células foram isoladas do meio de cultura e pesadas em balança de precisão para obtenção de peso médio de massa fresca (MF) (Figura 6). Após 24 horas, as membranas contendo o material filtrado foi levada à estufa com 50°C até atingir peso constante, para obtenção de massa seca (MS). Assim, a concentração de células, expressa em massa fresca e seca de células por volume de meio de cultivo apresentou um perfil de produção, identificando as diferentes fases de multiplicação e crescimento celular.

**Figura 6** - (A) Frascos contendo células de calo de BRS Moema. (B) Células de calo isoladas em membranas de acetado de celulose. (C) Bomba a vácuo para sucção de líquido.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 INDUÇÃO DE CALOS

A formação de calos iniciou aos cinco dias de cultura, com o intumescimento dos explantes, apresentando aspecto gelatinoso e com coloração variada entre bege e branco, sendo friáveis. A indução de calos em explantes foliares ocorreu aos 14 dias de cultivo, após a inoculação e em todos os explantes com 2,4-D e BAP, exceto no tratamento controle e nos tratamentos com 0,1 mg. L de 0,5 mg L de BAP. O 2,4-D quando utilizado isoladamente apresentou 40% e 80% de indução, o que demonstra a necessidade da interação com o BAP. Após 35 dias de cultivo, a maior porcentagem de formação de calos foi observada no



tratamento que combinou 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP apresentando 100% de calogênese (Tabela 1).

**Tabela 1** - Porcentagens de indução de calos em explantes foliares de *C. chinense* BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup>) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L<sup>-1</sup>), após 35 dias de cultivo.

2,4-D (mg. L <sup>-1</sup> )	BAP (mg. L <sup>-1</sup> )			
	0	1	2	4
0	0 Cb*	0 Db	0 Bb	0 Ba
1	80 Aa	80 Ba	80 Aa	80 Aa
2	40 Bc	100 Aa	80 Ab	80 Ab
4	40 Bc	60 Cb	80 Aa	80 Aa

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, e seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

Em relação a ACCC o tratamento controle bem como os que haviam 0,1 e 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, não resultaram em calogênese. O BAP utilizado isoladamente, apesar de apresentar indução de calos de 40% não foi tão eficiente para ACCC, apresentando somente 15% da média. Já o 2,4-D quando utilizado sem a interação do BAP demonstrou uma das maiores médias quando utilizado 1,0 mg. L<sup>-1</sup> (87,5%). No entanto, outros tratamentos demonstraram médias maiores de 70 e 87,5%, identificando assim, mais um fator importante para a interação desses dois hormônios. Os tratamentos com 0,1 mg. L de BAP e 0,1 mg. L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D resultaram na maior ACCC, com 87,5% da área coberta por células do calo em explantes foliares (Tabela 2).

**Tabela 2** – Médias em porcentagens da área coberta por células de calo (ACCC) em explantes foliares de *C. chinense* BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup>) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L<sup>-1</sup>) após 35 dias de cultivo.

2,4-D (mg. L <sup>-1</sup> )	BAP (mg. L <sup>-1</sup> )			
	0	1	2	4
0	0 Db*	0 Db	0 Cb	15 Ba
1	87,5 Aa	70 Bd	60 Bc	70 Ab
2	15 Cc	87,5 Aa	70 Ab	70 Ab
4	35 Bc	52,5 Cb	70 Aa	70 Aa

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, e seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

Após 35 dias de cultivo foi analisado o peso de massa fresca e seca de todos os explantes foliares submetidos às variações de reguladores de crescimento, evidenciando assim o tratamento que mais resultou em massa de calos (2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP) que apresentou um peso médio de 850,1 g bem como sua MF com 202,1 g. Esses resultados potencializam e evidenciam os demais resultados de indução de calos e ACCC para explantes foliares (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3** – Peso médio de massa fresca de explantes foliares de *C. chinense* BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup>) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L<sup>-1</sup>) após 35 dias de cultivo.

2,4-D (mg. L <sup>-1</sup> )	BAP (mg. L <sup>-1</sup> )			
	0	1	2	4
0	2,77 Db*	4,53 Dc	7,5 Db	24,3 Da
1	86,5 Bd	598,1 Ba	89,1 Cc	119,7 Cb
2	27,1 Cd	850,1 Aa	119,7 Bc	122,5 Bb
4	115,4 Ad	133,1 Cc	136,1 Ab	162,1 Aa

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, e seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

**Tabela 4** – Peso médio de massa seca de explantes foliares de *C. chinense* BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup>) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L<sup>-1</sup>) após 35 dias de cultivo.

2,4-D (mg. L <sup>-1</sup> )	BAP (mg. L <sup>-1</sup> )			
	0	1	2	4
0	2,1 Dc*	1,6 Dd	3,1 Db	9,3 Da
1	57,5 Ab	154,1 Ba	6,17 Cd	36,7 Cc
2	12,88 Cd	202,1 Aa	36,7 Bc	38,8 Bb
4	34,4 Bd	52,4 Cc	54,2 Ab	55,4 Aa

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, e seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

Em explantes nodais a indução de calos ocorreu em todos os tratamentos com 2,4-D e BAP, mesmo com a ausência dos reguladores. O BAP quando utilizado isoladamente apresentou somente 40% e 60% de indução de calos, no entanto, o 2,4-D quando utilizado

isoladamente apresentou 40%, 60%, 80% e 100%. Porém, os outros tratamentos em que esses reguladores se apresentaram interagidos entre si, as médias de porcentagens aumentaram entre os tratamentos. Após 35 dias de cultivo, pode-se observar 100% de calogênese nos tratamentos: 0,1 mg. L<sup>-1</sup>; 0,5 mg. L<sup>-1</sup> e 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L<sup>-1</sup> e 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP (Tabela 5).

**Tabela 5** - Porcentagens de indução de calos em explantes nodais de *C. chinense* BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup>) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L<sup>-1</sup>), após 35 dias de cultivo.

2,4-D (mg. L <sup>-1</sup> )	BAP (mg. L <sup>-1</sup> )			
	0	1	2	4
0	40 Db*	60 Ca	60 Ca	60 Ca
1	60 Cb	100 Aa	100 Aa	100 Aa
2	100 Aa	100 Aa	80 Bb	100 Aa
4	80 Ba	80 Ba	80 Ba	80 Ba

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, e seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

Aos 29 dias de cultivo, foi possível observar brotações no tratamento com 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 7). Esses explantes foram retirados do meio de cultura com reguladores de crescimento e transferidos para meios MS para avaliar o crescimento e desenvolvimento das brotações. Após 7 dias foi observada a oxidação de todos os explantes.

**Figura 7** - Brotação a partir de explantes nodais de *C. chinense* BRS Moema em meio MS suplementado com 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP após 29 dias de cultivo.



Em relação à ACCC, todos os tratamentos apresentaram 100% de área coberta por calos.

Após os 49 dias de cultivo foi analisado o peso de massa fresca e seca de todos os explantes nodais submetidos às variações de reguladores de crescimento, sendo possível observar os tratamentos que resultaram em maior proliferação de células de calos, resumidos nas tabelas 6 e 7.

**Tabela 6** – Peso médio de massa fresca de explantes nodais de *C. chinense* BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup>) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L<sup>-1</sup>) após 35 dias de cultivo.

2,4-D (mg. L <sup>-1</sup> )	BAP (mg. L <sup>-1</sup> )			
	0	1	2	4
0	10,5 Dd*	23,74 Dc	24,65 Db	35,8 Da
1	41,2 Cd	745,55 Ba	701,65 Cc	702,2 Cb
2	702,44 Bd	733,55 Cc	783,02 Bb	856,21 Aa
4	785,33 Ad	789,16 Ac	792,02 Ab	793,1 Ba

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, e seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

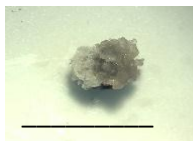




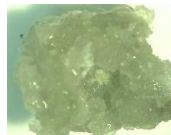
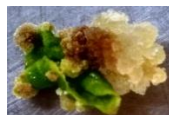






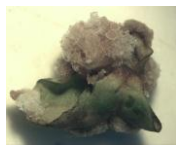


**Tabela 7** – Peso médio de massa seca de explantes nodais de *C. chinense* BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup>) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L<sup>-1</sup>) após 35 dias de cultivo.

2,4-D (mg. L <sup>-1</sup> )	BAP (mg. L <sup>-1</sup> )			
	0	1	2	4
0	5,01 Db*	3,05 Dd	4,19 Dc	5,6 Da
1	6,75 Cd	183,51 Ba	164,97 Cc	178,59 Cb
2	180,89 Bd	181,86 Cc	200,89 Bb	272,4 Aa
4	202,01 Ad	205,1 Ac	213,54 Ab	213,59 Ba

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, e seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

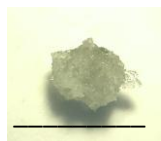

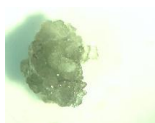













As tabelas 8 e 9 ilustram o desenvolvimento diferencial dos explantes foliares e nodais com 46 e 49 dias de cultivo, respectivamente, em relação às diferentes concentrações dos reguladores de crescimento utilizados. Os dois tipos de explantes tiveram calos similares. Observa-se a coloração esbranquiçada, ou às vezes translúcida dos mesmos, bem como a sua friabilidade. É possível observar o aspecto mais desenvolvido dos explantes cultivados na presença dos dois reguladores.

**Tabela 8** – Explantes foliares de *C. chinense* BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup>), após 35 dias de cultivo.

de cultivo.		BAP (mg. L <sup>-1</sup> )			
2,4 D (mg. L <sup>-1</sup> )	0	0,1	0,5	2,5	
0					
1					
2					
4					

Barra = 2cm.

**Tabela 9** – Explantes nodais de *C. chinense* BRS Moema submetidos a combinações fatoriais de BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg. L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup>), após 35 dias de cultivo.

cultivo:		BAP (mg. L <sup>-1</sup> )			
2,4 D (mg. L <sup>-1</sup> )	0	0,1	0,5	2,5	
0					
1					
2					
4					

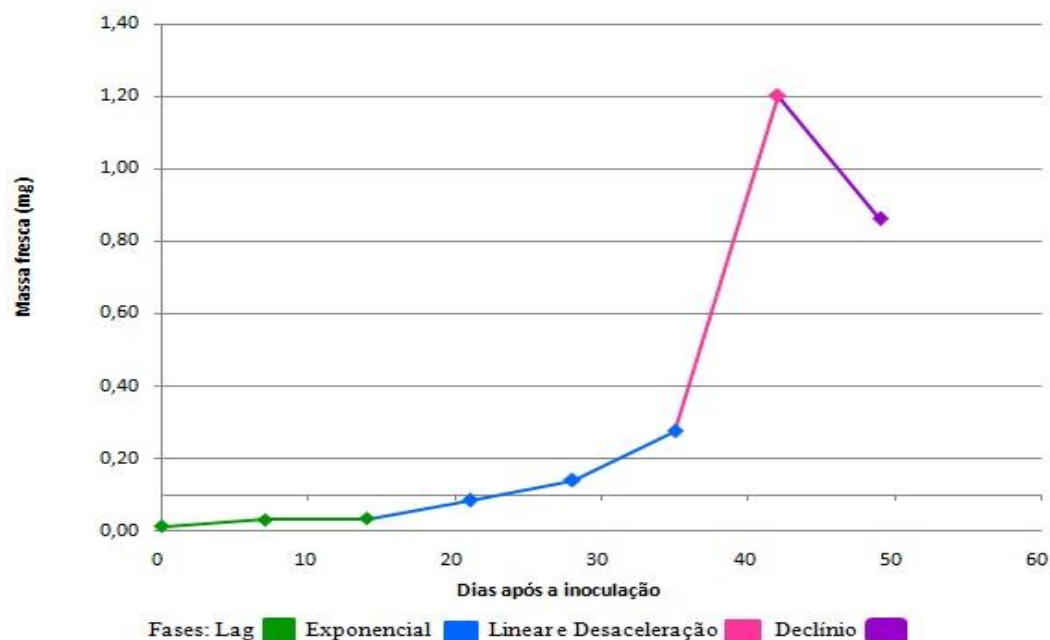
Barra = 2cm.

## 4.2 CRESCIMENTO DOS CALOS

As curvas de crescimento dos calos dos explantes foliares e nodais seguiram um padrão sigmóide, apresentando seis fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio.

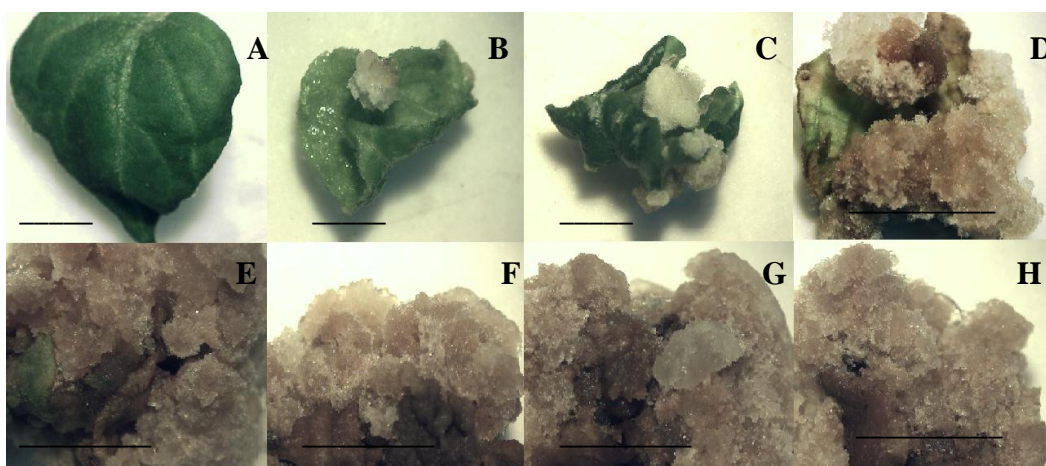
O crescimento dos calos de segmentos foliares apresentou fase lag do dia da inoculação até o 14º dia de cultivo; fase exponencial do 15º ao 35º dia; fase linear do 36º ao 39º dia; fase de desaceleração do 40º ao 42º dia; e a fase de declínio que se estendeu do 43º ao 49º dia de cultivo (Figura 8).

**Figura 8** - Curva de crescimento de calos de *C. chinense* BRS Moema obtidos a partir de explantes foliares inoculados em meio MS, contendo  $2,0 \text{ mg. L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0,1 \text{ mg. L}^{-1}$  de BAP durante 49 dias de cultivo.



O crescimento dos calos em explantes foliares e nodais de *C. chinense* BRS Moema foi satisfatório para o estabelecimento da curva de crescimento dos calos. As figuras 9 e 10 demonstram o desenvolvimento dos calos do dia da inoculação ao final do cultivo de cada explante.

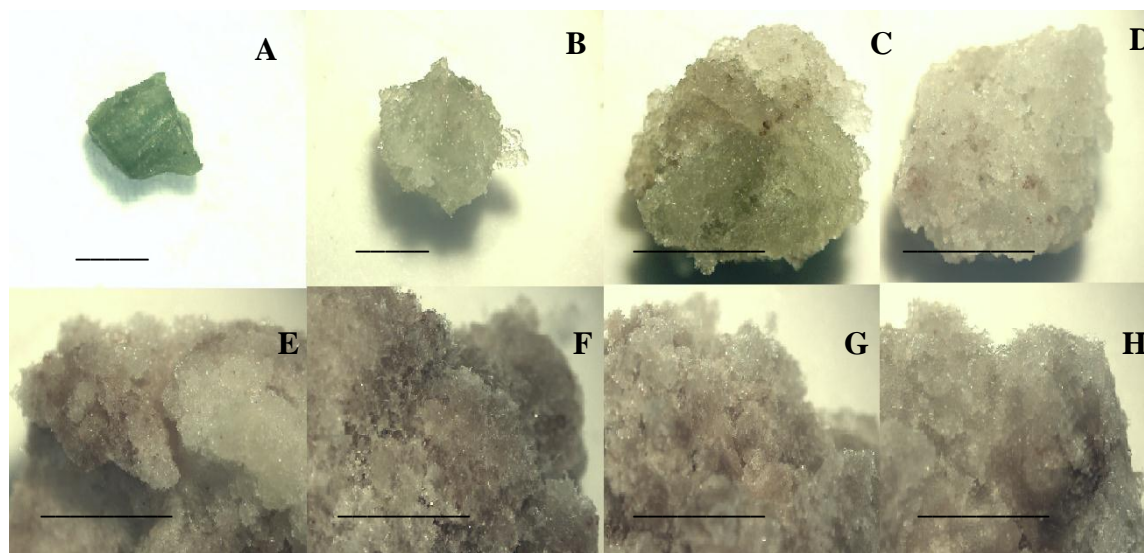
**Figura 9** – Desenvolvimento de calos em explantes foliares de *Capsicum chinense* BRS Moema em meio MS suplementado com  $2,0 \text{ mg. L}^{-1}$  de 2,4-D +  $0,1 \text{ mg. L}^{-1}$  de BAP. (A) Dia da inoculação; (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias; (G) 42 dias; (H) 49 dias.



Barras de A a C = 1cm. Base do retângulo de D a H = 2 cm.



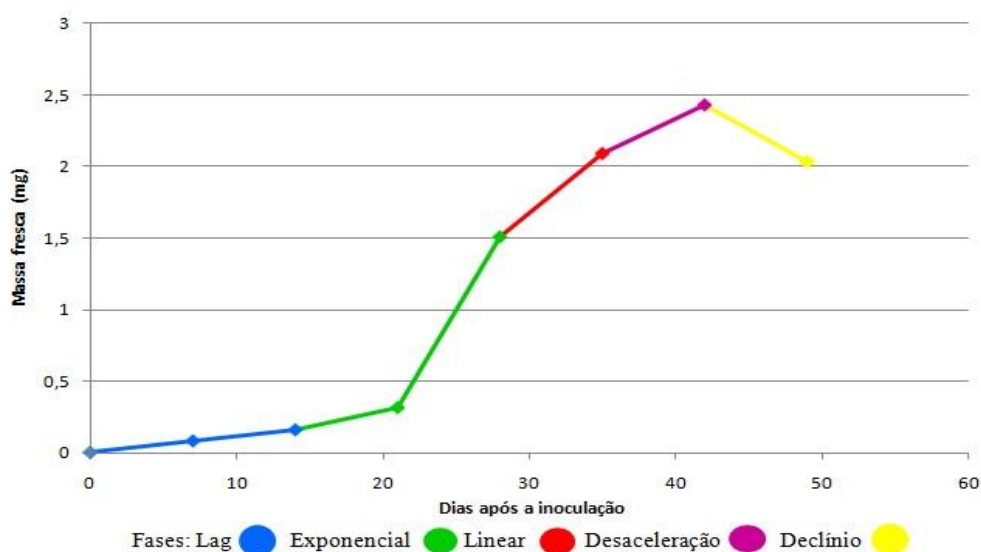
**Figura 10** – Desenvolvimento de calos em explantes nodais de *Capsicum chinense* BRS Moema em meio MS suplementado com 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP. (A) Dia da inoculação; (B) 7 dias; (C) 14 dias; (D) 21 dias; (E) 28 dias; (F) 35 dias; (G) 42 dias; (H) 49 dias.



Barras de A e B = 1cm. Base do retângulo de C a H = 2 cm.

O crescimento dos calos de explantes nodais, a fase lag teve ocorrência do dia da inoculação ao 14º dia de cultivo; a fase exponencial do 15º ao 28º dia; a fase linear do 29º ao 35º dia; a fase de desaceleração do 36º ao 42º dia; e a fase de declínio que ocorreu do 43º ao 49º dia de cultivo (Figura 11).

**Figura 11** - Curva de crescimento de calos de *C. chinense* BRS Moema obtidos a partir de explantes nodais inoculados em meio MS, contendo 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP durante 49 dias de cultivo.



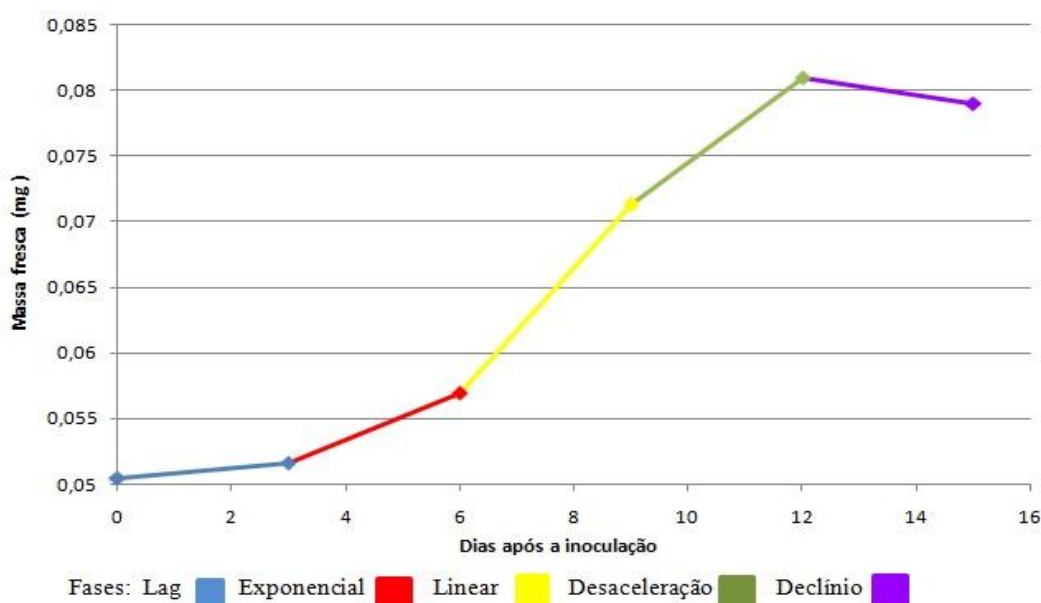


### 4.3 CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

As culturas de células em suspensão de *C. chinense* BRS Moema foram estabelecidas e subcultivadas de acordo com as avaliações obtidas da curva de crescimento dos calos. Os calos de explantes foliares foram subcultivados a partir do 33º dia de cultivo e os explantes nodais a partir do 30º dia de cultivo.

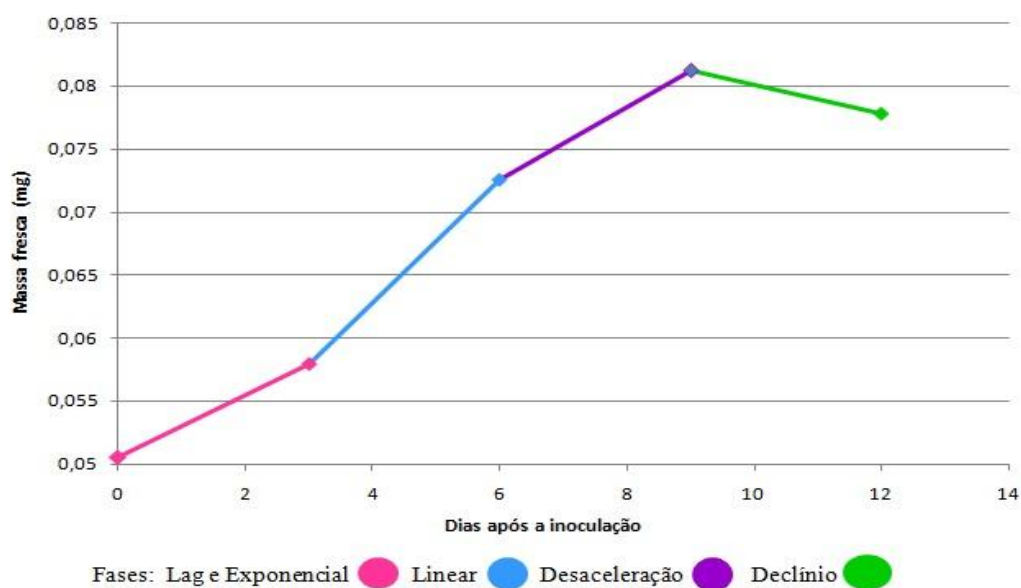
O crescimento das células de calos obtidos a partir de explantes foliares apresentou a fase lag, que se iniciou do dia da inoculação ao 3º dia de cultivo; fase exponencial do 4º ao 6º dia; linear do 7º ao 9º; desaceleração do 10º ao 12º dia; e declínio do 13º ao 18º dia de cultivo (Figura 12).

**Figura 12** - Curva de crescimento de células de calos em suspensão de *C. chinense* BRS Moema obtidos a partir de explantes foliares inoculados em meio MS, contendo 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP durante 18 dias de cultivo.



Já o crescimento das células de calos em suspensão a partir de explantes nodais a fase lag ocorreu do dia da inoculação ao 1º dia de cultivo; exponencial do 1º ao 3º dia; linear do 3º ao 5º dia; desaceleração 5º ao 8º dia; e declínio do 9º ao 12º dia de cultivo (Figura 13).

**Figura 13** - Curva de crescimento de células de calos em suspensão de *C. chinense* BRS Moema obtidos a partir de explantes nodais inoculados em meio MS, contendo 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP durante 12 dias de cultivo.



A maior produção de metabólitos secundários ocorre na fase estacionária. Em células de explantes foliares essa fase ocorreu do 12º ao 13º dia de cultivo. Em células de explantes nodais ocorreu do 8º ao 9º dia de cultivo.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.3 INDUÇÃO DE CALOS

Para a obtenção de protocolos de indução de calos em explantes foliares e nodais de *C. chinense* BRS Moema foram testados meios de cultivos suplementados com diferentes combinações de 2,4-D e BAP. Os calos obtidos no presente estudo apresentaram aspecto gelatinoso, com coloração variada entre bege e branco, sendo friáveis. Como mencionado por Souza et al. (2014), calos friáveis podem se diferenciar de calos compactos, por possuir células pouco agregadas e com menor densidade. Já os calos compactos, apresentam células mais espessas e com maior densidade. Os calos friáveis possuem diferentes tipos de células com diferentes características estruturais e histoquímicas, caracterizadas principalmente pela presença de pequenas células com crescimento rápido, isodiamétricas, com alta frequência de divisões celulares (SOUZA et al., 2011). Esse tipo de calo pode ser utilizado para iniciar culturas de células em suspensão, por fácil dispersão em meio líquido.

Umamaheswari e Lalitha (2007) ao utilizar explantes foliares de *C. annuum* L. na combinação de 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de KIN obtiveram indução de calos grandes e friáveis. Khan et al. (2011) utilizaram explantes internodais de *C. annuum* L. cv Pusa Jwala, e obtiveram 70% de indução de calos na concentração de 2,21 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e, quando combinado com 0,4 mg. L<sup>-1</sup> BAP, obteve 95% de indução de calos friáveis.

Assim como Valle (2003), estudando a influência de 2,4-D e BAP em explantes foliares de *Piper hispidinervum*, verificou que o cultivo desses explantes em meio contendo 5,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 10,2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP proporcionou a maior formação de calos friáveis. Briskin et al. (2001) obtiveram sucesso em concentrações menores desses reguladores, o que potencializou a indução de calos friáveis em explantes foliares de *Piper methysticum* e *Piper colubrinum* realizando subcultivos nas concentrações de 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente.

A obtenção de calos friáveis é de grande importância quando se almeja o cultivo de células em suspensão haja vista que as células se dividem rapidamente e se dispersam facilmente no meio de cultura, o que dificilmente ocorre em calos compactos, onde as células estão aderidas (CID, 1992).

Em explantes foliares de *C. chinense* BRS Moema a indução de calos iniciou aos 5 dias após a inoculação, apresentando calos com aspecto gelatinoso, transparente, com coloração variada entre branco e bege, sendo todos friáveis. Pereira et al. (2007) também observaram efeito positivo das auxinas em *C. annuum*, em meio com picloram (0,0; 0,5; 1,0 e

2,0 mg. L<sup>-1</sup>) que proporcionou a formação de calos com aspecto friável, enquanto nos meios com 2,4-D, ANA e AIB, nas mesmas concentrações, ocorreu a formação de calos com aspecto compacto.

Os reguladores quando utilizados isoladamente também resultaram em formação de calos, porém não tão eficientes quando combinados entre si. Utilizando somente 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP a porcentagem alcançou 40% de indução de calos. Diferentemente, Rocha (2014) visando desenvolver um protocolo para a indução de calos em explantes foliares de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis, subsidiando o estabelecimento de culturas de células em suspensão para a produção *in vitro* de metabólitos secundários, obteve maior indução de calos com a concentração de 4,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, o que resultou em 100% de calogênese em todos os explantes.

Porcentagens maiores (40% e 80%) foram obtidas com a utilização de 2,4-D, porém, essa auxina em altas concentrações se mostrou excessiva para esses explantes causando um aumento na porcentagem de indução proporcional ao aumento na sua concentração. Esse regulador tem sido amplamente utilizado para a indução de calos (PALÚ, 2004; NOGUEIRA, 2008; SANTOS, 2010). Torres et al. (1998), citam que o 2,4-D apresenta caráter indutor para o intumescimento e calosidade, mas que pode ser tóxico em alguns tipos de tecido (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

No presente trabalho, o tratamento com 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP resultou em 100% de calos friáveis em todos os explantes foliares. Umamaheswari & Lalitha (2007) ao utilizar explantes foliares de *C. annuum* L. na combinação de 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de KIN obtiveram calogênese satisfatória, de calos grandes e friáveis, considerado ideal para o estabelecimento de suspensões celulares, por fácil dissociação dessas células em meio líquido. Com resultados similares, Balbuena et al. (2009) também visando suspensão celular, utilizou explantes de folhas e pecíolos de *Piper solmsianum* para calogênese e alcançou maior crescimento de calos com 0,2 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP. Santiago (2003) avaliou o efeito de combinações de 2,4-D e BAP em meio MS para induzir calos em explantes foliares de *P. hispidinervium* e observou que o maior percentual de calos verdes friáveis, foi de 98,3%, com a combinação de 6,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP.

As citocinas tem diferentes funções na planta, entre elas a regulação da divisão celular nos meristemas (FORKET et al, 2013b), e em combinação com auxinas produz calos (FORKET et al., 2013a). O balanço hormonal entre citocininas e auxinas induz a essa

produção de calos, demonstrando total associação entre os reguladores para obtenção de calogênese (ANDRADE, 2006).

Em explantes nodais, as combinações de 2,4-D e BAP foram satisfatórias, várias delas alcançando 100% de calogênese. O BAP quando utilizado isoladamente alcançou médias de 40% e 60% de calogênese, enquanto o 2,4-D quando isolado alcançou médias de 40%, 60%, 80% e 100%. No entanto, os resultados demonstraram que quanto mais interação entre esses reguladores, melhor e maior a média de porcentagem de calogênese, vários tratamentos demonstrando 100% de calogênese para esse tipo de explante.

Otroshy et al. (2011) quando avaliou os efeitos de diferentes combinações de reguladores de crescimento de plantas *in vitro* para micropropagação de *C. annuum* L. submeteram segmentos nodais em meio MS a diferentes concentrações de citocininas e verificou que o melhor resultado obtido combinava 2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de IBA. Com a adição de uma auxina IAA (0,5 mg. L<sup>-1</sup>) e NAA (0,1 mg. L<sup>-1</sup>) juntamente com o citocinina BAP (2,0 mg. L<sup>-1</sup>) conseguiu obter indução máxima de calos quando comparados aos meios contendo somente citocininas. Khan et al. (2011) utilizaram explantes internodais de *C. annuum* L. cv Pusa Jwala, e obtiveram 70% de indução de calos na concentração de 2,21 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e, quando combinado com 0,4 mg L<sup>-1</sup> BAP, obteve 95% de indução de calos friáveis.

A formação de calos no explante nodal sem adição de reguladores, pode ter ocorrido devido ao balanço hormonal presente no explante (POZO et al., 2005) ou ainda, segundo Dalponte et al. (2010), quando um tecido cultivado *in vitro* passa por injúrias físicas ou químicas tende a desenvolver como resposta o calo.

A presença de brotações em explantes nodais na concentração de 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP está de acordo com o observado em *C. annuum* por Otroshy et al. (2011) os quais regeneraram plântulas desta espécie a partir de explantes nodais utilizando 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP. Ebida e Hu (1993) obtiveram brotações em *C. annuum* L. cv. Early California Wonder utilizando variações de 1,0 a 10 mg. L<sup>-1</sup> de BAP em combinação com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Verma et al. (2013), visando à regeneração de *C. annuum* L. cv. California Wonder, utilizaram meio MS suplementado com diferentes combinações e concentrações de auxinas e citocininas (BAP, IAA, TDZ e GA<sub>3</sub>) em explantes de cotilédones, obtendo calos no meio suplementado com 0,88 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ + 0,10 mg. L<sup>-1</sup> de AIA. Em geral, a presença de uma citocinina é essencial para a produção de brotos. Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que para brotações as concentrações de citocinina isoladas são satisfatórias.

Embora tenha ocorrido indução de calos na ausência desses reguladores, a área coberta por células de calos teve as menores porcentagens nesses tratamentos, evidenciando a indispensabilidade da combinação entre estes reguladores de crescimento para uma efetiva proliferação de células de calos.

Em explantes foliares o tratamento controle e os tratamentos com 0,1 mg. L<sup>-1</sup> e 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP não resultaram em calogênese. Com a utilização de 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP a ACCC resultou em somente 15%. O 2,4-D quando utilizado isoladamente alcançou a maior média para a área coberta por células de calo, com 87,5%. Porém, quando os reguladores agiram mutuamente os resultados foram positivos, resultando em 70% e 87,5% de ACCC, o que demonstra total importância da associação entre esses dois reguladores. As maiores porcentagens resultaram de tratamentos que combinaram 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D, sendo este, mais um fator relevante para a interação entre esses reguladores. Cerqueira et al. (2002), trabalhando na indução de calos em segmentos foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* Linn) obteve o melhor resultado quando se adicionou ao meio MS 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de ANA + 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, resultando em 100% de área coberta com calos. No entanto, para Rodrigues e Almeida (2010), que ao obter calos de *Cissus sicyoides* L., na concentração de 6,0 mg. L<sup>-1</sup> BAP, obteve maior número de explantes com 100% de área coberta com calo, o que demonstra a importância de cada e necessidade de cada espécie para que haja então, um balanço hormonal.

Em explantes foliares não ocorreu formação de calos nos tratamentos controle e com 0,1 mg. L<sup>-1</sup> e 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP afetando assim a ACCC. Em segmentos nodais, os resultados se mostraram totalmente contrários, apresentando 100% de ACCC em todos os explantes. Essa diferença de resposta entre explantes extraídos da mesma planta é justificada pelo fato de que segmentos nodais apresentam maior atividade meristemática em relação aos explantes foliares, que contêm maior número de células diferenciadas (POZO et al., 2005). Segundo Soares (2003), a concentração de 3 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D foi a mais eficiente em relação a maior área coberta por calos (80%) em *Inga vera* subsp. Affinis. Tavares (2002) estudando o efeito do 2,4-D na indução de calos em paricá a partir de segmentos nodais e cotiledonares obteve 90% de calogênese em relação a ACCC.

Os explantes foliares e nodais foram submetidos a pesagens após 46 e 49 dias, respectivamente, para obtenção de pesos médios de matérias fresca e seca para comparação e afirmação dos tratamentos em que resultaram em maior indução de calos de ambos os explantes. Em explantes foliares o tratamento em que resultou em maior indução de calos e

ACCC apresentou um peso médio de massa fresca de 850,1g e após 48h submetidos a secagem em estufa, apresentou peso médio de massa seca de 202,1g. Em segmentos nodais o tratamento que resultou em maior indução de calos apresentou peso médio de massa fresca de 856,21g e 272,4g de massa seca. Os calos friáveis obtidos em ambos os explantes de BRS Moema foram satisfatórios para o estabelecimento de curva de crescimento dos calos e suspensão celular. Esses resultados evidenciam a potencialidade da interação entre os reguladores 2,4-D e BAP para obtenção de calos friáveis, bem como sua ACCC para sua utilização em suspensões celulares. Na literatura, não foram encontrados trabalhos referentes ao estudo de MF e MS de espécies de *C. chinense*.

## 5.4 CRESCIMENTO DOS CALOS

O comportamento da curva de calos ocorre em função da espécie em estudo e do explante utilizado (FEITOSA et al., 2013). O padrão sigmóide é característico do tipo de tecido desdiferenciado (PEIXOTO et al., 2011).

As curvas de crescimento dos calos de explantes foliares e nodais de BRS Moema seguiram um padrão sigmóide, apresentando seis fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio. Esse tipo de curva de crescimento já foi observado em outras espécies de plantas lenhosas de uso medicinal como a japecanga (SANTOS et al., 2007), copaíba (AZEVEDO, 2003), sangra d'água (LIMA et al., 2007), murici-pequeno (NOGUEIRA et al., 2008), barbatimão (CASTRO et al., 2008) e aroeira-do-sertão (VASCONCELOS et al., 2012).

No presente trabalho, o crescimento dos calos friáveis em explantes foliares e nodais, se deu em 46 e 49 dias, respectivamente. Araújo et al. (2011) obteve calos friáveis a partir de explantes de hipocótilo de *Amburana cearensis* utilizando 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e a análise do crescimento dos calos demonstrou que a fase de maior crescimento ocorreu entre o 21º e 49º dia de cultivo, com comportamento próximo ao linear até os 49 dias após a inoculação.

Em relação às fases de crescimento dos calos de explantes foliares e nodais, a fase lag teve a mesma duração em ambos os explantes (14 dias). Valle (2003) avaliando o crescimento de calos obtidos com base em segmentos foliares de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) observou a fase lag em torno de 10 dias de cultivo. Santos et al. (2003), observaram a ocorrência dessa fase até o 42º dia após a inoculação, em calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi.

A fase exponencial foi mais breve também nos explantes nodais, ocorrendo do 15º ao 28º dia. Contudo, em explantes foliares, ocorreu do 15º ao 35º dia. Em *Coffea arabica* esse período estendeu por cerca de 35 dias entre 42º até o 77º dia de cultivo (SANTOS, 2003). Já em murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) esta fase durou cerca de 20 dias, ocorrendo entre 20º a 40º dias de cultivo (NOGUEIRA et al., 2008).

A fase linear nos explantes foliares ocorreu do 36º ao 39º dia, e nos explantes nodais, do 29º ao 35º dia de cultivo. Nogueira et al. (2008) observou a ocorrência desta fase entre o 40º e o 60º dia de cultivo em murici-pequeno. Azevedo (2003) observou a fase linear na copaíba, entre o 98º e 126º dia.

A fase de desaceleração ocorreu do 40º ao 42º dia para explantes foliares e do 36º ao 42º dia para explantes nodais. Assim, o momento ideal para o subcultivo das células de calos em meio líquido para o estabelecimento de suspensões celulares ocorreu entre o 30º e o 33º dia de cultivo, para explantes foliares e nodais, respectivamente. Nogueira et al. (2008) verificaram essa fase entre o 60º e o 80º dia após a inoculação de murici-pequeno. Mas Azevedo (2003) verificou que essa fase ocorreu entre o 126º e o 154º dia após a inoculação em seu trabalho com copaíba. Para Smith (1992), a determinação dessa fase é importante, pois indica o momento necessário para se transferir os calos para um novo meio de cultura (repicagem), devido a redução de nutrientes, secagem do ágar, acúmulo de substâncias tóxicas e/ou diminuição do oxigênio no interior das células dos calos.

A fase de declínio se estabeleceu do 43º ao 49º dia para explantes foliares e do 43º ao 49º dia para explantes nodais. O ciclo de crescimento dos calos é mais curto em explantes foliares (39 dias) do que foi observado em explantes nodais (41 dias). Ciclos mais longos são observados em outras espécies e gêneros. Café conilon (*Coffea canephora* Pierre) iniciou a fase estacionária no 54º dia (SANTOS et al., 2010), enquanto no murici-pequeno ocorreu entre o 80º e 100º dia após a inoculação (NOGUEIRA et al., 2008).

Os resultados apresentados pela curva de crescimento de calos de *C. chinense* BRS Moema demonstram crescimento rápido, o qual possivelmente está associado à ocorrência de um ciclo celular também rápido, entretanto são necessários estudos mais elaborados de citogenética para confirmação desta inferência.



### 5.3 CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

As culturas de células em suspensão de explantes foliares e nodais de *C. chinense* BRS Moema foram estabelecidas e subcultivadas a partir de calos friáveis com duração de 12 e 15 dias, respectivamente. Outros trabalhos relatam crescimento de células relativamente mais prolongados, como Delgado et al. (2002) a fim de estabelecer suspensões celulares em *Piper aduncum* de pecíolos e entrenós utilizando concentrações de 0,2 e 0,5 mg. L de 2,4-D e 0,5 mg. L de BAP e DICAMBA alcançaram crescimento máximo de 24 dias. Já com *Piper solmsianum*, Balbuena et al. (2009) estabeleceu suspensão celular a partir de calos de pecíolos utilizando 0,2 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP alcançando crescimento de células em 36 dias.

A fase lag em explantes foliares ocorreu do dia da inoculação ao 3º dia de cultivo e até o 1º dia para explantes nodais. Esses resultados foram similares aos obtidos em *Cataranthus roseus* (PETERSEN, 2006) e em *Cordia verbenaea* (LAMEIRA, 2003). Delgado-Paredes et al. (2013) que obteve calos de explantes foliares e de pecíolos em *P. cernuum* e *P. crassinervium*, observou o crescimento das células em suspensão, teve duração de aproximadamente 20 dias nessa fase.

O período de máxima divisão celular na fase exponencial teve duração do 4º ao 6º dia de cultivo em explantes foliares e do 2º ao 3º dia em para explantes nodais. Em células em suspensão de *Salvia frutiosa* essa fase durou cerca de 12 dias, entre o 4º e o 16º dia de cultivo (KARAM et al., 2003). Em *Piper solmsianum* esse período se estendeu por 6 dias, entre o 6º e o 12º dia de cultivo.

O período de crescimento linear ocorreu entre o 7º e o 9º dia para explantes foliares e do 4º ao 5º dia para explantes nodais. Nessa fase, a divisão celular diminui e as células tendem a crescer (SMITH, 1992). Karam et al. (2003) observaram a fase linear em *Salvia frutiosa* entre o 16º e 20º dia. Já em *Cataranthus roseus*, Petersen (2006) observou a ocorrência dessa fase entre o 5º e o 7º dia de cultivo.

Após o crescimento das células, estas entram na fase de desaceleração seguida pela fase estacionária, onde há um maior número de células com menor capacidade de divisão celular, entrando em estágio de diferenciação celular. Essas fases ocorreram entre o 10º e o 12º dia para explantes foliares e do 6º ao 8º dia para explantes nodais.

Não foi observada a fase estacionária, embora seja nessa fase a ocorrência de maior acúmulo de metabólitos secundários, porém com menor crescimento das células. Delgado-

Paredes (2013) constatou essa fase dos 27 aos 31 dias de cultivo de células de *P. cernuum*. Balbuena et al. (2009) submeteu células em suspensão de *P. aduncum* e *P. umbellatum* e obteve o maior número de metabólitos secundários na fase estacionária aos 31 dias de cultivo.

O declínio das células ocorreu do 13º ao 18º dia em explantes foliares e do 9º ao 12º dia para explantes nodais. Dalpone et al. (2010) estabeleceu cultura de células em suspensão de algodoeiro e constatou que as células começaram a entrar em declínio ao 25º dia de cultivo.

Pesquisas realizadas indicam que nas plantas do gênero *Capsicum* são encontradas substâncias com atividade inseticida e de repelência, tais como alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais, provenientes do metabolismo secundário (LUZ, 2007). A utilização de plantas medicinais no controle de pragas é de grande importância para a agricultura familiar e para o desenvolvimento sustentável. A região Amazônica dispõe de grande disponibilidade de plantas que possibilitam o incremento de novas pesquisas, onde novos produtos poderão vir a substituir ou diminuir o uso de defensivos químicos (SILVA et al., 2007). Dessa forma, este estudo vai subsidiar trabalhos relacionados à identificação do potencial bioativo de metabólitos secundários de espécies de *Capsicum*, servindo como método alternativo no controle do ácaro *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Assim, depois de extraídos e testados os princípios ativos de *C. chinense* BRS Moema, poderá ser então uma alternativa para controlar esse carrapato bovino e minimizar os impactos ambientais causados por acaricidas sintéticos e então apoiar o desenvolvimento da região Norte.

## CONCLUSÃO

Para a indução de calos em explantes foliares de *C. chinense* BRS Moema recomenda-se a utilização de meio de cultura MS suplementado com a combinação de 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP + 2 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D para explantes de segmentos nodais, os quais resultaram em 100% de calogênese e 100% da sua área coberta por células de calo.

As curvas de crescimento dos calos de explantes foliares e nodais de *C. chinense* BRS Moema seguiram um padrão sigmóide, com ocorrência das fases lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio. O momento ideal para o subcultivo das células de calos em meio líquido para o estabelecimento de suspensões celulares ocorrem do 40º ao 42º dia para explantes foliares e do 36º ao 42º dia de cultivo para explantes nodais.

Não foi possível delimitar a fase estacionária no crescimento de suspensões celulares, no entanto, pode-se inferir que a produção máxima de metabólitos secundários ocorre aproximadamente do 9º e 10º dia em explantes foliares e do 5º ao 6º dia em explantes nodais.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, W. F. **Atuação do pulse na orgânogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro***. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- ARAÚJO, L. S. Estabelecimento e indução de calos de *Amburana Cearensis* (Arr. Cam) SMITH. In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais & Congresso Brasileiro, 5, 2011, Joinville. **Anais**. Joinville: XVIII Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 2011. p. 126-130.
- ARNALDOS, T. L. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x Ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 315-322, 2001.
- AZEVEDO, K. S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- BALBUENA, T. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; KATO, M. J.; FLOH, E. I. S. *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 274-281, 2009.
- BARBOSA, F. B. C. A Biotecnologia e a conservação da biodiversidade amazônica, sua inserção na política ambiental. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 69-94, 2001.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; ALENCAR, A. A.; NUNES X. P.; TOMAZ, A. C. A.; SENA FILHO, J. G.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; DA-CUNHA, E. V. L. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 135-154, 2008.
- BARBOZA, G. E.; BIANCHETTI, L. B. Three new species of *Capsicum* (Solanaceae) and a key to the wild species from Brazil. **Systematic Botany**, v. 30, n. 4, p. 863-871, 2005.
- BASU, S. K. *Capsicum*: historical and botanical perspectives. In: **Capsicum: The genus Capsicum**. 2ª ed. Canadá, 2003, p. 1-15.
- BIANCHETTI, L. B. **Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de *Capsicum* (Solanaceae) ocorrentes o Brasil**. 74 f. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília - UNB, Brasília, 1996.
- BIAVATTI, M.; MAENSI, V.; LEITE, S. N.; REIS, A. Ethno pharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 640-653, 2007.
- BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: vegetable and spice *Capsicum***. New York: Cabi, 1999. 230p.

BRISKIN, D.; KOBAYASHI, H.; METHA, A.; GAWIENOWSKI, M.; AINSWORTH, L.; SMITH, M. A. L. Production of kavapyrones by Kava (*Piper mehysticum*) tissue cultures. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 6, p. 556-561, 2001.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.; TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Meios Nutritivos. In: TORES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, v. 1, 1998.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 39-53, 2008.

CASTRO, A. H. F.; LIMA, M. M.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; SÓTER, M. O. Curva de crescimento, atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais em calos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae-Mimosoideae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 4, n. 2, p. 99-104, 2008.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; DE MORAIS, A. R.; DE CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. D. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 2, p. 301-308, 2002.

CID, L. P. B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, v. 18, n. 1, p. 2-7, 1992.

CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. Conservação e Desenvolvimento. In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. (Eds) **Biodiversidade Amazônica – exemplos e estratégias de utilização**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. 1ª edição. Manaus, 1999.

DALPONTE, F.; VALLE, J. A. B.; VALLE, R. C. S. C. Uso de adsorventes de compostos fenólicos e diferentes explantes na produção de massa celular. **Revista Dynamis**, v. 15, n. 2, p.12-17, 2010.

DELGADO, G. E.; ROJAS, C.; NUNOMURA, S. M, KATO, M. J. Analisis fitoquímico en suspensiones celulares de *Piper aduncum* L. (“matico”). **Avances en y Ciencia & Tecnología**, v. 3, p. 15-26, 2002.

DELGADO-PAREDES, G. E.; KATO, M. J.; ROJAS-IDROGO, C. Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *Piper* sp. **Boletim Latino Americano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 3, n. 12, p. 269-282, 2013.

EBIDA, A. I. A; HU, C. *In vitro* morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explants. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 2, p.107-110, 1993.

ESHBAUGH, W. H. **Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery**. In: J. JANICK AND J. E. SIMON. New York: New Crops. 1993. p. 132-139.

FEITOSA, L. S. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.

FLORES, R.; NICOLoso, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogenéticos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.

FORKET, D.E. Auxina: O primeiro hormônio do crescimento vegetal descoberto. In TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013a. p. 543-580.

FORKET, D.E; KIEBER, J.; HILL, C.C. Citocininas: Reguladores da divisão celular. In TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013b. p. 619-646.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2001. p. 105-124.

FRIGHETTO, R. T. S. Preparação e avaliação da bioatividade de extratos vegetais. In: Congresso Brasileiro De Entomologia, 16., 1997, Salvador. **Resumos...** Salvador: SEB; Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 1997. p. 10.

FUMAGALI, E.; GONCALVES, R. A. C.; MACHADO, M. de F.P.S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. B de. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernae montanae* Aspidosperma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FURDEN, B. V.; HUMBURG, A.; FUSS, E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6- methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 312-317, 2005.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. D. **Plant propagation by tissue culture**. Netherlands: Background, 2008. 501p.

GERTH, A.; SCHMIDT, D.; WILKEN, D. The production of plant secondary metabolites using bioreactors. In: **XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Plant Biotechnology: From Bench**. 2006. p. 95-104.

GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPB, p.19-28, 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, 1998. p. 183-260.

GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, L. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1996. v. 2, p. 533-568.

- GUIMARAES, S. S.; POTRICH, M.; SILVA, E. R. L.; WOLF, J.; PEGORINI, C. S.; OLIVEIRA, T. M. Ação repelente, inseticida e fagoinibidora de extratos de pimenta dedo-de-moça sobre o gorgulho do milho. **Agricultural Entomology**, v. 81, n. 4, p. 322-328, 2014.
- GYORGY, Z.; TOLONEN, A.; NEUBAUER, P.; HOHTOLA, A. Enhanced biotransformation capacity of *Rhodiola rosea* callus cultures for glycosid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, p. 129-135, 2005.
- HAAS, J.; GARCIA, B. C.; ALVES, L. F. A.; HAIDA, K. S. Efeito de estratos aquosos vegetais sobre a lagarta-do-cartucho. **Agricultural Entomology**, v. 81, n. 1, p. 79-82, 2014.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2002.
- HUNZIKER, A. T. The genera of solanaceae illustrated, arranged according to a new system. In: A. R. G. **Gantner Verlag**. London: Ruggell, 2001. 500p.
- INNECCO, R. Uso de óleos essenciais como defensivo agrícola. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 3., 2006, Belém. **Anais...** Belém: Embrapa Amazônia Oriental: SEBRAE, 2006. p. 98-99.
- KARAN, N. S. JAWAD, F. M.; ARIKAT, N. A.; SHIBL, R. A. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 117-121, 2003.
- KHAN, H. *In vitro* organogenesis from internode derived callus cultures of *Capsicum annuum* L. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 84-89, 2011.
- KNOTKOVA, H.; PAPPAGALLO, M.; SZALLASI, A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? **The Clinical Journal of Pain**, v. 24, n. 2, p. 142-154, 2008.
- KRIKORIAN, A. D. Propagación clonal *in vitro*. In: ROCA, W. M.; MRROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. 970 p.
- LAMAS, F. M. **Reguladores de Crescimento**. In: Embrapa Agropecuária Oeste. Algodão: tecnologia de produção. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão, 2001. 296p.
- LAMEIRA, O. A. Cultura de tecidos (manual). Belém: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2003. 41p.
- LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, p. 56-63, 2000.
- LEUNG, F. W. Capsaicin-sensitive intestinal mucosal afferent mechanism and body fat distribution. **Life Sciences**, v. 83, n. 4, p. 1-5, 2008.
- LIMA, E. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). **Magistra**, v. 19, n. 3, p. 184-190, 2007.

LIMA, R. A. **Aclimatização de mudas micropropagadas de café Conilon (*Coffea canephora* Pierre ex. Froehner)**. 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2011.

LUZ, F. J. F. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.)**. 2007. 70 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

MACHADO, F.A.P.S.A.; CAPELASSO, M.; OLIVEIRA, A.J.B.; ZAMUNER, M.L.M.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M.F.P.S. Alkaloid production and Isozymes expression from cell suspension culture of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). **Journal of Plant Science**1, v. 1, n. 4, p. 324-331, 2006.

MAPELI, A. M.; MOREIRA, M. A.; FINGER, F. L. Fisiologia e conservação pós-colheita das pimentas. In: RÊGO, E. R.; FINGER, F. L.; RÊGO, M. M. **Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum* spp.)**. Paraíba, Areia, p. 71-85. 2011.

MARTINEZ, S. S. (Ed.). **O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 2002, 142 p.

MENDONÇA, E. G. Genetic transformation of *Eucalyptus camaldulensis* by agrobalistic method. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 419-429, 2013.

MOGOR, G.; LIMA, G. P. P.; MOGOR, A. F. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial *in vitro* e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 3, p. 37-47, 2007.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow thandbio-assaywith tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, n. 3, p. 419-429, 1962.

MUSETTI, L. **Avaliação de efeitos de extratos de *Piper nigrum* L. sobre adultos de *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera, Curculionidae)**. 1991. 79 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991.

NOGUEIRA, R. C. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

OTROSHY, M.; MORADI, K.; KHAYAM NEKOU EI, M. The effect of different cytokenins in propagation of *Capsicum annuum* L. by *in vitro* nodal cutting. **Trakia Journal of Sciences**, v. 9, n. 3, p. 21-30, 2011.

PALÚ, E.G.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 736-742, 2004



PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; GUPTA, S.; TALWAR, S.; RAJWANSHI, V. K.; RAJESH, K.; AZIM, A.; MALHOTRA, S.; KUMAR, N.; JAIN, R.; SHARMA, N. K.; TYAGI, O. M. D.; LAWRIE, S. L.; ERRINGTON, W.; HOWARTH, O.W.; OLSEN, C. E.; SINGH, S. K.; WENGEL, J. Polyphenols and alkaloids from piper species. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1069-1078, 1998.

PEIXOTO, C. P.; CRUZ, T. V.; PEIXOTO, M. F. S. Análise quantitativa do crescimento de plantas: Conceitos e Prática. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n. 13, p. 51-76, 2011.

PEREIRA, S. P.; GUIMARÃES, R. J.; BARTHOLO, G. F.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVES, J. D. Crescimento vegetativo e produção de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) recepadors em duas épocas, conduzidos em espaçamentos crescentes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 643-649, 2007.

PETERSEN, R Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. 2006 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PICKERSGILL, B. Domestication of plants in the Americas: insights from mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 925-940, 2007.

PIERIK, R. L. M. Cultivo in vitro de lãs plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.

POZO, J. C. D.; MATAS, M. A. L.; PARRA, E. R.; GUTIERREZ, C. Hormonal control of the plant cell cycle. **Biologia Plantarum**, v. 123, p.173-183, 2005.

REBOUÇAS, F. S.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmento foliar. **Cultivo in vitro de Plantas Medicinais**, v. 4, p. 35-42, 2009.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA. Comunicação para transferência de tecnologia/ EMBRAPA Hortaliças, 2000. 113p.

REIFSCHNEIDER, F. J. B; RIBEIRO, C. S. da C. Cultivo. In: RIBEIRO, C. S. da C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 39-54. 2008.

RIBEIRO, C. S. C; LOPES, C. A; CARVALHO, S. I. C; HENZ, G. P; REIFSCHNEIDER, F. J. B. 2008. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 200p.

ROCHA, J. F. **Indução de Calos em Explantes Foliares de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**. 2014. 42 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2014.

ROSS, C. W. Hormones and growth regulators: auxins and gibberellins. In: SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**, p. 357- 377, 1992.

RUFINO, J. L. S.; PENTEADO, D. C. S. **Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte. p. 7-15. 2006.

SADO, M. **Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva.** 2009. 90 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

SANTIAGO, E. J. A. Efficient *in vitro* regeneration from cotyledon explants in Bell pepper (*Capsicum annuum* L. cv. California Wonder). **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 4, n. 3, p. 391-396, 2003.

SANTOS, A. S.; ARAÚJO, S. F.; GOULART, H. F.; CAETANO, L. C.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; SANTA'ANA, A. E. G. A dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 538-541, 2007.

SANTOS, C. G. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arábica* L., cultivar Rubi. **Ciencia e Agrotecnología**, v. 27, n. 3, p. 571-577, 2003.

SANTOS, M. R. A. **Germinação, calogênese e caracterização e saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach.** 1998. 81f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; SARUBO, V. Determination of callus growth curve in conilon coffee. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 1, p. 133-136, 2010.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de Plantas Frutíferas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 2005. p. 155-173.

SILVA, W. C.; RIBEIRO, J. D.; SOUZA, H. E. M.; CORRÊA, R. S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 2, p. 293-298, 2007.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments.** Texas, U.S.A. Academic Press, 2012. 208 p.

SMITH, R. M. **Plant tissue culture: techniques and experiments.** San Diego: Academic Press, 1992. 171p.

SOARES, G. de A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro (*Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn.).** 2003. 90 f. Dissertação de Mestrado, Curso e Pós-graduação em Agronomia, UFLA, Lavras, 2003.

SOUZA, A. V. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) Mart.** 2003. 126 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SOUZA, J.M.M.; BERKOV, S.; SANTOS, A.S. Improvement of friable callus production of *Boerhaavia paniculata* Rich and the investigation of its lipid profile by GC/MS. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1015-1027, 2014.

SOUZA, J.M.M.; TOMAZ, M.L.; ARRUDA, S.C.C.; DEMÉTRIO, C.G.B.; VENABLES, W.N.; MARTINELLI, A.P. Callus sieving is effective in improving synchronization and frequency of somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 4, p. 703-307, 2011.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p.768-780, 2003.

TAVARES, M. A. G. C. **Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosoides* L. (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col: Curculionidae)**. 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

TAVARES, M. A. G. C. **Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosoides* L. (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col: Curculionidae)**. 2008. 59 f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

TEWKSBURY, J. J.; REAGAN, K. M.; MACHNICKI, N. J.; CARLO, T. A.; HAAK, D. C.; PENÁLOZA, A. L.; LEVEY, D. J. Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 33, p. 11808-11811, 2008.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. 864 p.

UMAMAHESWARI, A.; LALITHA, V. *In vitro* effect of various growth hormones in *Capsicum annuum* L. on the callus induction and production of capsaicin. **Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 5, p. 545-551, 2007.

VALLE, R. de C. S. C. **Estratégias de cultivo de células de Pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**. 2003. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

VASCONCELOS, J. N. C.; CARDOSO, N. S. N.; OLIVEIRA, L. M.; SANTANA, J. R. F.; FERNANDEZ, L. G.; BELLO KOBLOITZ, M. G.; SILVA, M.L.C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Planas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 592-597, 2012.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogenesis of *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* *hibrid* (Sterculiaceae). **Acta amazonica**, v. 34, n. 4, p. 507-511, 2004.

VERMA, S.; DHIMAN, K.; SRIVASTAVA, D. K. Efficient *in vitro* regeneration from cotyledon explants in Bell pepper (*Capsicum annuum* L. cv. California Wonder). **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 4, n. 3, p. 391-396, 2013.

VERPOORTE, R.; MARASCHI, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: YUNES R. A.; CALIXTO J.B. (orgs.) **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 381- 432.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. **Ação de bioestimulante na cultura da soja (*Glycinemax* L. Merrill)**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2004. 47p.

WILKEN, D.; GONZÁLEZ, E. J.; HOHE, A.; JORDAN, M.; KOSKY, R. G.; HIRSCHMANN, G. S.; GERTH, A. Comparison of secondary metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. In: HVOSLEF-EIDE, A.K.; PREIL, W. (Eds.). **Liquid culture systems for *in vitro* plants propagation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005. p. 525-538.

WITT, D., BOSLAND, P. W. **Peppers of the world: an identification guide**. Ten Speed Press, Berkeley, California, 1997, p. 219.

WITT, D.; BOSLAND, P. W. **The complete chile pepper book**. A gardener's guide to choosing, growing, preserving and cooking. Timber Press. Portland London, 2009. 336p.